

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO DE LOS SANTOS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN
MANEJO DE SUELOS Y AGUA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON
POTENCIAL ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Pyricularia*
oryzae Y *Burkholderia glumae*, EN LA FILÓSFERA DEL CULTIVO DE ARROZ
EN LA REPÚBLICA DE PANAMÁ.

ALEX HUMBERTO CRUZ GONZÁLEZ

CIP: 8-449-938

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN
MANEJO DE SUELOS Y AGUA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2019

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON
POTENCIAL ANTAGÓNICO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE Pyricularia
oryzae Y Burkholderia glumae, EN LA FILÓSFERA DEL CULTIVO DE ARROZ
EN LA REPÚBLICA DE PANAMÁ.**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN MANEJO DE
SUELOS Y AGUA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

APROBADO

_____ Asesor
Martha Chaves De Von Chong M.Sc.

_____ Co-Asesor
Rito Herrera Ph.D.

_____ Co-Asesor
José Villarreal Ph.D.

Panamá, República de Panamá

2019

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi mejor amigo celestial, mi Padre Jesús Sacramentado, a mis dos magníficos hijos Alex Javier y Daniel Josué, amigos terrenales: José Ángel Casas, Jhoel Tuñón, Luis A. Barahona, Marcial Mendoza, Arístides Hernández, Patricia Cheng, Maydeé Córdoba y a los tantos que me dan su amistad desinteresada. Les dedico estas líneas de agradecimientos. Mil bendiciones para ustedes y sus familias.

AGRADECIMIENTO

Agradezco inmensamente a Dios, por permitirme tener vida, familia y sabiduría cada día. Por enseñarme a ser: perseverante, apasionado y congruente en las diversas etapas presentadas en esta vida. A mis padres Victoria y Lin, por ser alentadores de mis aventuras académicas y profesionales. A mi esposa Lourdes, que me brindó lealtad, alegría, confianza y motivación para terminar este proyecto. A la Universidad Nacional, docentes, estudiantes y administrativos, que me brindaron su ayuda para llevar a feliz término esta investigación. Especialmente a los docentes asesores Martha de Von Chong y Rito Herrera por guiarme y enseñarme el inmenso potencial del área de la microbiología.

Un agradecimiento especial a mi amigo Jhoel Tuñón, por las palabras de aliento y guía en las diversas actividades desarrolladas, durante muchas horas de trabajo. Así como a todos mis compañeros del grupo de maestría, por su dedicación y esfuerzo a ser mejor. Gracias, porque en estos años hicieron de mí un mejor profesional y una mejor persona.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
I. MARCO TEÓRICO	5
1. Importancia del cultivo del arroz a nivel mundial	5
2. Fisiología del cultivo del arroz	6
3. La filósfera	7
4. Añublo del arroz (<i>Pyricularia oryzae</i>).	7
5. Añublo bacterial de la panícula del arroz (<i>B. glumae</i>).	9
6. Bacterias benéficas.	10
7. Contenido de elementos nutritivos y su relación con la susceptibilidad de la planta a bacteriosis.	12
8. Antagonismo	13
8.1. Potencial antagonista de microorganismos endófitos.	13
9. Control biológico.	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	15
1. Sitio de muestreo.	15
2. Proceso de aislamiento de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz (<i>Oryza sativa</i>)	17
3. Proceso de aislamiento de hongos endófitos de la filósfera del arroz (<i>Oryza sativa</i>)	20

4. Bioensayos de enfrentamiento in vitro	22
4.1. Bioensayo dual de las bacterias aisladas de la filósfera del arroz frente al fitopatógeno <i>B. glumae</i> .	22
4.2. Bioensayo dual de los hongos aislados de la filósfera del arroz frente al fitopatógeno <i>P. oryzae</i> .	24
5. Identificación de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz con capacidad antagónica.	27
5.1. Cinética de crecimiento de bacterias con capacidad antagónica.	28
6. Identificación de hongos endófitos con capacidad antagónica.	8
7. Variables evaluadas durante el aislamiento de bacterias y hongos de la filósfera del arroz.	29
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
1. Bacterias epifíticas de la filósfera	30
1.1. Prospección de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz.	30
1.2. Cepas bacterianas epifíticas identificadas con potencial antagónico frente a <i>B. glumae</i> .	32
1.3 Cinética de crecimiento bacteriano	35
2. Hongos endófitos de la filósfera	40
2.1. Prospección de hongos endófitos de la filósfera	40
2.2. Hongos endófitos identificados con potencial antagónico frente a <i>P. oryzae</i> .	42
IV. CONCLUSIONES	48
V. RECOMENDACIONES	49
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
VII. ANEXOS	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables evaluadas.	29
Tabla 2. Valores medios del diámetro del halo de inhibición para el enfrentamiento entre bacterias epifíticas antagonistas frente a <i>B. glumae</i> en el cultivo de arroz.	34
Tabla 3. Cepas seleccionadas para la cinética de crecimiento bacteriano.	36
Tabla 4. Datos de la absorbancia <i>Bacillus spp</i> vs <i>B. glumae</i>	36
Tabla 5. Datos de la absorbancia Cepa <i>B. cereus</i> vs <i>B. glumae</i>	37
Tabla 6. Resumen de ajuste para la prospección de hongos endófitos	41
Tabla 7. Secciones de la hoja en las cuales se aislaron los géneros fúngicos con actividad antagónica positiva frente a <i>P. oryzae</i> .	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parcela experimental. Cultivo de arroz variedad Gab 8 en fase vegetativa, Comunidad de los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón.	15
Figura 2. Plantas sanas, sin lesiones necróticas. Parcela experimental..	16
Figura 3. Diagrama para el aislamiento de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz.	19
Figura 4. Diagrama para el aislamiento de hongos endófitos de la filósfera del arroz. Laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé -Universidad de Panamá.	21
Figura 5. Esquema de las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> entre las bacterias epifíticas aisladas y <i>B. glumae</i> .	23
Figura 6. Esquema de las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> entre las cepas fúngicas aisladas y <i>P. oryzae</i> .	26
Figura 7. Prospección de bacterias epifíticas de la hoja. Variables analizadas.	30
Figura 8. Número de aislamientos registrados en las distintas secciones de la hoja (apical, media, basal).	31
Figura 9. Cepas bacterianas aisladas de la filósfera del arroz, con diámetros en el halo de inhibición \geq a 4 mm.	33
Figura 10. Bacteria epifítica <i>B. subtilis</i> , de la sección apical de la hoja, presenta halo de inhibición.	34
Figura 11. Curva de crecimiento <i>B. glumae</i> vs <i>Bacillus spp.</i>	37
Figura 12. Cinética de crecimiento <i>B. glumae</i> vs <i>B. cereus</i> .	38
Figura 13. Prospección de hongos endófitos de la filósfera.	40

Figura 14. Hongos endófitos con antagonismo positivo.	42
Figura 15. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de las cepas fúngicas con actividad antagónica positiva frente <i>P. Oryzae</i> .	43
Figura 16. Inhibición del crecimiento de <i>P. oryzae</i> por hongos endófitos antagonistas aislados de la filósfera.	44
Figura 17. <i>Fusarium spp</i> localizado en la sección basal de la hoja, en enfrentamiento antagónico contra el fitopatógeno <i>P.oryzae</i> .	45
Figura 18. <i>A. niger</i> en enfrentamiento contra el fitopatógeno <i>P. oryzae</i> .	46
Figura 19. <i>Trichoderma spp</i> en enfrentamiento contra el fitopatógeno <i>P. oryzae</i> .	47

RESUMEN

Se realizaron muestreos de la filósfera de arroz, en una parcela bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia, ubicada en la comunidad de Los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá. En el laboratorio de Microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé, Universidad de Panamá, se efectuaron aislamientos de hongos y bacterias de la filósfera del arroz, pruebas de enfrentamiento *in vitro* e identificación de los microorganismos (hongos y bacterias) con potencial antagonico frente a los patógenos *Burkholderia glumae* y *Pyricularia oryzae*, causantes de las enfermedades conocidas como añublo bacterial de la panícula del arroz y tizón de la panícula (*pyriculariosis*) respectivamente. Se aisló un total de 64 cepas bacterianas epifíticas de las cuales 24 correspondieron a la sección apical de la hoja, 11 de la sección media y 30 de la sección basal de la filósfera, de estas, 21 presentaron antagonismo positivo (halo ≥ 4 mm de diámetro) ante el fitopatógeno *B. glumae*, se identificaron las 10 con el mayor halo de inhibición, correspondiendo al género *Bacillus* spp. A su vez, se aisló un total de 68 cepas fúngicas endófitas de la filósfera (20 de la sección apical, 22 de la sección media y 26 de la sección basal), de las cuales 29 mostraron antagonismo positivo (PCIR $\geq 40\%$) ante el fitopatógeno *P. oryzae*, correspondiendo a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

PALABRAS CLAVES: Bacterias, antagonismos, hongos, filósfera.

ABSTRACT

Samplings of the rice phyllosphere were carried out in a plot under the subsistence organic agriculture modality, located in the community of Alvéos, Cabuya corregimiento, Antón district, Coclé province, Republic of Panama. In the laboratory of Microbiology of the Regional University Center of Coclé, University of Panama, isolations of fungi and bacteria from the rice phyllosphere, tests of in vitro confrontation and identification of microorganisms (fungi and bacteria) with antagonistic potential against the pathogens *Burkholderia glumae* and *Pyricularia oryzae* (strains facilitated by INDICASAT), causing the diseases known as bacterial blight of the rice panicle and blight or panicle burning (pyriculariosis) respectively. A total of 64 epiphytic bacterial strains were isolated (24 from the apical section, 11 from the middle section and 30 from the basal section of the phyllosphere). Of these, 21 had positive inhibition halo (≥ 4 mm in diameter) before the phytopathogen *B. glumae*, identifying the 10 strains with the most significant inhibition halos, all resulting from the genus *Bacillus* spp. In turn, a total of 68 fungal strains of the phyllosphere were isolated (20 from the apical section, 22 from the middle section and 26 from the basal section), all endophytic, of which 29 showed positive antagonism (PCIR $\geq 40\%$) before the phytopathogen *P. oryzae*, corresponding to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Fusarium*.

KEYWORDS: Bacteria, antagonisms, fungi, philosophies

INTRODUCCIÓN

En la República de Panamá el arroz es un rubro de gran importancia, la producción promedio para el año 2015-2016 fue de 282,568 toneladas de arroz en cáscara y se sembraron 92,380 hectáreas (Instituto Nacional de Estadística y Censo, 2016), en virtud de ello, la búsqueda de métodos alternativos para el control de fitopatógenos de importancia agrícola para este cultivo se ha convertido en una prioridad para el país. En este sentido, se ha demostrado que la microbiota de la filósfera de diversos cultivos, incluyendo el arroz, puede defender a las plantas de los agentes patógenos al ejercer una acción antagónica contra estos. Investigadores han logrado aislar y utilizar bacterias y hongos de la filósfera para el control biológico de muchos patógenos (Poveda, *et al*, 2010).

Dicho esto, el tema de estudio expuesto en el presente escrito, consistió en caracterizar bacterias epifíticas y hongos endófitos de la filósfera del arroz (Variedad Gab 8 con manejo orgánico), con potencial antagónico *in vitro* frente a dos fitopatógenos de importancia agrícola y económica en el país; nos referimos a *Burkholderia glumae* causante de la enfermedad conocida como añublo bacteriano de la panícula del arroz y *Pyricularia oryzae* uno de los fitopatógenos de mayor importancia económica, causante de la piriculariosis. Esto con el fin de ampliar la información científica sobre microorganismos antagonistas autóctonos en Panamá, contribuyendo con el crecimiento del cepario nacional de microorganismos biocontroladores e introduciéndonos a la vez en los fundamentos para la implementación de métodos alternativos destinados a desarrollar tecnologías productivas sustentables.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Aislar y caracterizar microorganismos con potencial antagónico para el control biológico de *Pyricularia oryzae* y *Burkholderia glumae*, en la filósfera del cultivo de arroz en la República de Panamá.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar bacterias y hongos de la filósfera del arroz (*Oryza sativa*) variedad Gab 8 bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia en Los Alveos de Antón.
- Identificar bacterias y hongos con potencial antagónico frente a fitopatógenos de arroz.
- Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de los microorganismos aislados frente a *Burkholderia glumae* y *Pyricularia oryzae*.

I. MARCO TEÓRICO

1. Importancia del cultivo del arroz a nivel mundial

El cultivo de arroz constituye en la actualidad el grano básico de más de dos mil millones de personas alrededor del planeta, que representan la tercera parte de la población mundial. Un 90% de la producción mundial depende de pequeños agricultores y comunidades en los países empobrecidos, generalmente en superficies inferiores a la hectárea. El consumo mundial de este producto es, desde mediados de los años ochenta de alrededor de 65 kilogramos per cápita al año, del que más del 87.0% se dedica a la alimentación humana o a manufactura alimenticia.

Se conocen más de 40.000 diferentes variedades de arroz, de las cuales se comercializan principalmente dos variedades: el arroz africano (*Oryza glaberrima*) y el arroz asiático (*Oryza sativa*). La planta puede cultivarse en zonas de diferentes altitudes, desde el nivel del mar hasta zonas con altura de 2500 metros, requiere de suelos con alto contenido de arcilla, que retienen y conservan la humedad por más tiempo (Franquet, 2004).

2. Fisiología del cultivo del arroz

Según la secretaria de agricultura y ganadería; Dirección de Ciencias y Tecnologías Agropecuarias de Honduras, se distinguen tres fases de desarrollo, las cuales tienen períodos de crecimiento definidas en cuanto a la diferenciación de la planta y los días de duración:

La fase vegetativa: por lo general dura de 55 a 60 días en las variedades de período intermedio. Y comprende desde la germinación de la semilla, emergencia, macollamiento (ahijamiento), hasta la diferenciación del primordio floral.

La fase reproductiva: incluye el período desde la formación del primordio floral (14-7 días antes de la emergencia de la panícula), hasta la emergencia de la panícula (floración). Esta fase dura entre 35 y 40 días.

La fase de madurez: abarca desde la emergencia de la panícula (floración), el llenado y desarrollo de los granos (estado lechoso y pastoso) hasta la cosecha (madurez del grano) y dura de 30 a 40 días.

3. La filósfera

El término Filósfera fue implementado por Last en 1955 y Ruinen en 1956, para describir la superficie de las hojas de las plantas como un ambiente que es física, química y biológicamente diferente del resto de la hoja o del ambiente exterior que lo rodea (Riedere y Muller, 2006).

El ambiente de la filósfera es considerado como hostil para la colonización de organismos, pues no existe una fuente rica de nutrientes. (Leveau y Lindow, 2001). Las comunidades microbianas de la filósfera son diversas e incluyen microorganismos que pueden encontrarse como epífitos en la superficie de la planta o endófitos dentro de los tejidos de ésta (Lindow y Brandl, 2003).

4. Añublo del arroz (*Pyricularia oryzae*).

Este hongo es el limitante biótico más importante en el cultivo de arroz, conocido internacionalmente como añublo o quemazón del arroz. Es casi norma natural que donde haya arroz (*Oryza sativa*), tarde o temprano habrá *Pyricularia*, esto significa en términos agronómicos que el cultivo del arroz se encuentra constantemente amenazado. (Muller, 1984).

Las lesiones varían desde pequeños puntos color café, hasta la típica mancha en forma de rombo, con su parte color verde oliva, gris o blanco, limitada (no siempre) por un borde fino café oscuro, en algunos casos, la lesión se rodea por un halo amarillento. El hongo puede atacar diferentes partes de la planta tales como: hoja, collar foliar, nudo del tallo y la panícula (Muller, 1984).

Las lesiones varían desde pequeños puntos color café, hasta la típica mancha en forma de rombo, con su parte color verde oliva, gris o blanco, limitada (no siempre) por un borde fino café oscuro, en algunos casos, la lesión se rodea por un halo amarillento. El hongo puede atacar diferentes partes de la planta tales como: hoja, collar foliar, nudo del tallo y la panícula (Muller, 1984).

Los organismos endófitos como hongos o bacterias, que durante parte o todo su ciclo de vida invaden tejidos vegetales vivos, causan infecciones asintomáticas dentro del tejido vegetal. Dado que algunas asociaciones micorrízicas deforman la planta, permitiendo detectar los síntomas de su infección, ellas quedan excluidas en esta definición (Wilson, 1995).

5. Añublo bacterial de la panícula del arroz (*B. glumae*).

El añublo bacteriano de la panícula del arroz, causado por *B. glumae*, ha aumentado su incidencia en los últimos años (Pérez y Saavedra, 2011). En 2005 la bacteria se reportó en Panamá, Cuba, República Dominicana, luego en 2007 en Colombia y en 2009 en Nicaragua (Correa, *et al.*, 2007).

B. glumae es una bacteria gram negativa y aeróbica, causante de la enfermedad conocida como añublo bacterial de la panícula en la planta de arroz.

Entre sus propiedades microbiológicas se encuentra que es multiflagelada (de 2 o más pares de flagelos) y encapsulada. Metabólicamente es capaz de reducir el nitrato, hidrolizar la gelatina, degradar el almidón y degradar la pectina, además es H₂S negativo (Brenner *et al.*, 2005).

El principal hospedante de esta bacteria es *Oryza sativa* (Arroz), pero también se ha reportado causando daños en: *Allium cepa* (cebolla), *Esculentum lycopersicum* (tomate), *Sesamum indicum* (ajonjolí), *Fulanum melongena* (berenjena) y *Capsicum sp.* (pimentón picante) (Bellido, 2005; CABI, 2005). El género *Burkholderia* es un importante componente de la comunidad microbiana. Se reportan más de 30 especies, ocupando diferentes nichos ecológicos, que se pueden presentar en el suelo, agua, plantas, animales y humanos. Este género es de amplia distribución y se registran especies no patogénicas en control biológico de hongos, biorremediación y promotoras del desarrollo de plantas (FLAR, 2010).

6. Bacterias benéficas.

Las enfermedades constituyen una limitante en el cultivo de arroz. Las más relevantes son las causadas por bacterias que hasta hace un tiempo presentaban poca importancia. Sin embargo, existen bacterias que manifiestan facciones benéficas y son conocidas como rizobacterias, promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (Plant Growth Promoting) por sus siglas en inglés; a lo largo de las investigaciones científicas, varios grupos de bacterias han sido eficientemente aisladas y multiplicadas para el desarrollo de inoculantes utilizados en una escala extensiva (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Las bacterias endófitas son capaces de generar cambios fisiológicos drásticos que modulan el crecimiento y el desarrollo de la planta (Hardoim *et al.*, 2008). Se evaluaron 12 cepas de *Bacillus sp.* con actividad antagonista *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* atribuida a la producción de metabolitos secundarios, de las cuales cuatro cepas correspondieron a *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, produciendo compuestos termoestables de tipo lipopeptídico con acción antifúngica (como iturinas, surfactinas y fengicinas) y la producción de compuestos volátiles, indicando que estas dos características son parte de los mecanismos de acción de estos aislamientos, para el control del hongo (Blanco-Zapata, 2012).

Estas propiedades de los miembros del género *Bacillus*, se han aprovechado para la obtención de formulaciones líquidas comercializables, cuyo principio activo está constituido por los metabolitos antifúngicos producidos por estas bacterias, como el elaborado a partir de una cepa patentada de *Bacillus subtilis* (QST713), que contiene más de treinta compuestos bioquímicos de tipo lipopeptídico y que provee un control efectivo

para un amplio espectro de enfermedades en cereales, frutales, hortalizas y flores causadas por hongos (Pal y McSpadden, 2006).

Las bacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos biológicos que existen como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en la parte aérea, como en la raíz de las plantas hospederas y están presentes en la rizósfera, además favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mondino y Silvana, 2006).

Las bacterias del género *Pseudomonas* , han sido estudiadas como importantes agentes de biocontrol, por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos fitopatógenos, como bacterias, hongos, nemátodos y virus, los cuales pueden llegar a reducir considerablemente la producción de cultivos (Chaves, 2007).

Los organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos como: sideróforos, ácidos cianhídricos y antibióticos. Además, se ha comprobado que inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos microorganismos fitopatógenos del suelo (Chaves, 2007).

7. Contenido de elementos nutritivos y su relación con la susceptibilidad de la planta a bacteriosis.

La materia orgánica es la fuente primordial de energía para los microorganismos., es degradada por una serie de reacciones secuenciales, regidas por enzimas. La lignina es el componente vegetal más recalcitrante. La degradación provoca la formación de ácidos húmicos. La presencia de sustancias fenólicas y flavonoides que tienen propiedades fungistáticas, las cuales en muchos casos están en mayores concentraciones en las células epidérmicas, mientras que la formación de dichas sustancias se ve limitada y por tanto hay acumulación de fenol cuando las plantas tienen deficiencias de algunos nutrientes como cobre (Cu) y boro (B).

La presencia de formas poliméricas de silicio (Si) que actúan como una barrera física para la penetración del patógeno. La tasa de difusión y la composición de los exudados citoplasmáticos al exterior, aspectos que se afectan por la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la concentración de azúcares y aminoácidos es elevada en las hojas cuando hay deficiencia de potasio (K), y como estas sustancias favorecen el desarrollo de los hongos, su mayor concentración favorece las enfermedades fungosas. La concentración de aminoácidos es también alta cuando hay excesos de N. La permeabilidad de las membranas citoplasmáticas se aumenta cuando hay deficiencia de calcio (Ca) o de B y esto favorece la acumulación de aminoácidos y azúcares en el apoplasto (región externa al citoplasma), lo cual ocurre también con la deficiencia de K, que limita la síntesis de polímeros. iv) La participación del Ca en la estructura de la pared celular, cuya rigidez se pierde por deficiencia de dicho elemento y por tanto se facilitan las infecciones. (Vargas, 2004).

8. Antagonismo

Es la interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004).

8.1. Potencial antagonista de microorganismos endófitos.

Los microorganismos endofíticos para ser considerados como agentes potenciales de biocontrol, requieren ciertas características. Como número uno, que no sea patógeno para plantas, hombres o animales; además, debe tener elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos, después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta y puede que el microorganismo se vea reprimido fácilmente por los demás habitantes de esta; como número dos, debe tener la capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de microorganismos patógenos, por debajo del nivel crítico. Es muy importante, que tenga capacidad abundante de reproducción en condiciones *in vitro* para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial; además, debe ser de aplicación fácil (Hernández y Escalona, 2003).

9. Control biológico.

El control biológico ha incrementado su importancia recientemente ya que disminuye la aplicación de agroquímicos, evitando el deterioro de los suelos y la acumulación de residuos químicos en el ambiente (Pal y McSpadden, 2006).

Se ha encontrado que la regulación biológica de patógenos foliares, frecuentemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (filoplano o filósfera) y que el éxito de dicho antagonista depende de su capacidad para establecerse como microbiota epífita (Blakeman y Fokkema, 1982).

Se ha encontrado que especies de bacterias aeróbicas formadoras de endosporas (BAFEs) de la filósfera de las plantas, como las del genero *Bacillus*, pueden llegar a tener gran potencial como controladores biológicos debido a su presencia en diferentes tipos de suelos, su tolerancia a altas temperaturas, su rápido crecimiento en medios líquidos y su capacidad de colonizar su superficie foliar (Tejera, *et al.* 2011).

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Sitio de muestreo.

Las plantas en estudio fueron tomadas al azar (muestreo al azar eliminando efecto borde) en una parcela de 10 m² cultivada con la variedad de arroz IDIAP Gab 8 (Figura 1), bajo el sistema de agricultura orgánica de subsistencia (MIDA- Agencia de Antón, 2017); la zona está ubicada en la comunidad de Los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá. El sitio de muestreo fue seleccionado para la bioprospección de microorganismos debido a que no estaba sometido a los efectos de los agroquímicos (MIDA, agencia de Antón, provincia de Coclé, comunicación oral).



Figura 1. Parcela experimental. Cultivo de arroz variedad Gab 8 en fase vegetativa, Comunidad de los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá, (UTM Datum WGS84 591361 E; 943492).

Las muestras sin ningún tipo de lesiones necróticas (Figura 2), fueron colectadas durante las fases fenológicas: vegetativa (21 días), floración (75 días) y maduración (95 días) durante el período comprendido entre septiembre a diciembre de 2016. En cada fase fenológica se tomaron tres muestras (3 plantas al azar), se colocaron en bolsas plásticas para trasladarlas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Panamá, Centro Regional Universitario de Penonomé y procesarlas en 24 h.



Figura 2. Plantas sanas, sin lesiones necróticas. Parcela experimental en la Comunidad de los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá.

2. Proceso de aislamiento de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz (*Oryza sativa*)

En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología del Centro Regional Universitario de Coclé, Universidad de Panamá, durante los meses de septiembre de 2016 a septiembre de 2017, se procedió a separar la filósfera de la zona basal de cada una de las plantas de arroz colectadas durante las tres fases fenológicas evaluadas en el cultivo (vegetativa, floración, maduración). Las hojas (filósfera) de las plantas muestreadas fueron procesadas con el objetivo de aislar bacterias epifíticas, con las cuales se realizaron pruebas de identificación y de antagonismo *in vitro* frente a *B. glumae*.

El primer paso consistió en tomar 7 hojas de cada planta muestreada (hojas libres de lesiones) por fase de cultivo (vegetativa, floración, maduración) se procedió a separar la sección apical, media y basal de las hojas. De cada sección se cortaron segmentos de 2x2 cm, para luego proceder con la desinfección de estos. Para ello, se colocaron bajo agua de grifo durante 5 min eliminando todos los residuos de suelo y otras materias extrañas.

Seguidamente, las secciones se colocaron por separado en bolsas plásticas, agregando 20 ml de agua peptonada y homogenizando durante 1 min a 200 rpm (Stomacher Seward®). Se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) de cada sección foliar sumergida y homogenizada en peptona (Ávila *et al.*, 2014).

De estas diluciones se tomaron alícuotas de 0.7 ml y se dispersó por agotamiento sobre la superficie del agar tripticasa soya (TSA) con un asa de Drigalski, para el aislamiento de

bacterias totales (2 réplicas por dilución), incubando a 28°C por 72 h (Graciano *et al.*, 2006).

Transcurrido el tiempo de la incubación, se realizó el recuento de las colonias bacterianas, luego se tomaron con un asa (asa kohle) 2 colonias por réplica, sembrándolas mediante estrías cruzadas en nuevos platos Petri con TSA para fomentar su crecimiento y garantizar su pureza mediante observaciones macro y microscópicas. Las cepas puras se transfirieron a tubos inclinados con TSA conservando en el refrigerador a 4°C hasta ser enfrentadas *in vitro* al fitopatógeno *B. glumae*. En la figura 3 se presenta el diagrama de procesos.

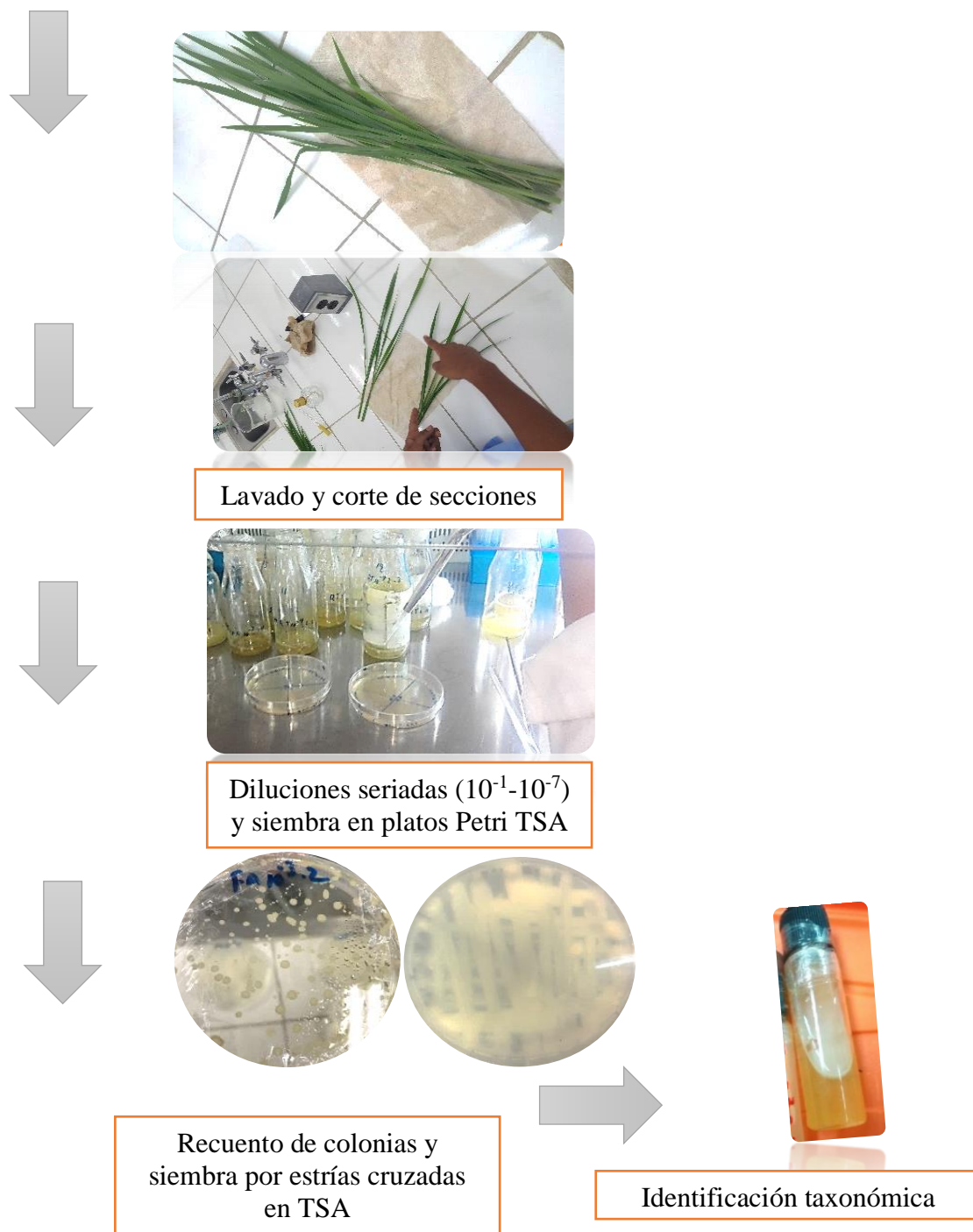


Figura 3. Diagrama para el aislamiento de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz. Laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé -Universidad de Panamá.

3. Proceso de aislamiento de hongos endófitos de la filósfera del arroz (*Oryza sativa*)

Al igual que para el aislamiento de bacterias epifíticas, las hojas (filósfera) de las plantas de arroz fueron procesadas con el objetivo de aislar hongos endófitos. Con estos se realizaron pruebas de identificación y de antagonismo *in vitro* frente al fitopatógeno *P. oryzae*.

Por cada ciclo de cultivo, se tomaban 7 hojas sanas de las plantas de arroz muestreadas, cada sección de la hoja (apical, media, base) fue cortada en cuadrados de 2x2 mm, después lavados con abundante agua de grifo por 5 min., luego con alcohol al 70% por 1 min., después se sumergieron en cloro al 4% por 3 min; en alcohol al 70% por 30 segundos y finalmente en alcohol al 40% por 30 segundos.

Seguidamente los trocitos de tejido se colocaron en papel filtro estéril para eliminar humedad; por ultimo fueron colocados en platos Petri con agar PDA (Potato Dextrose Agar) para el aislamiento de hongos (3 réplicas por sección de la hoja). Se incubo a 28°C, alternando 16 h. luz y 8 h. de oscuridad por 8 días (Chávez, 2016). Transcurrido el tiempo de la incubación, se realizó el recuento de las colonias fúngicas, seleccionando de 2 a 3 colonias por réplica

Las colonias seleccionadas fueron repicadas en nuevos platos Petri con PDA para fomentar su crecimiento y garantizar la pureza mediante observaciones macro y microscópicas. Las colonias puras se transfirieron a tubos inclinados con medio de cultivo PDA conservando a temperatura ambiente en cajas selladas para su posterior identificación y enfrentamiento frente a *P. oryzae*. En la figura 4 se muestra el diagrama de procesos.

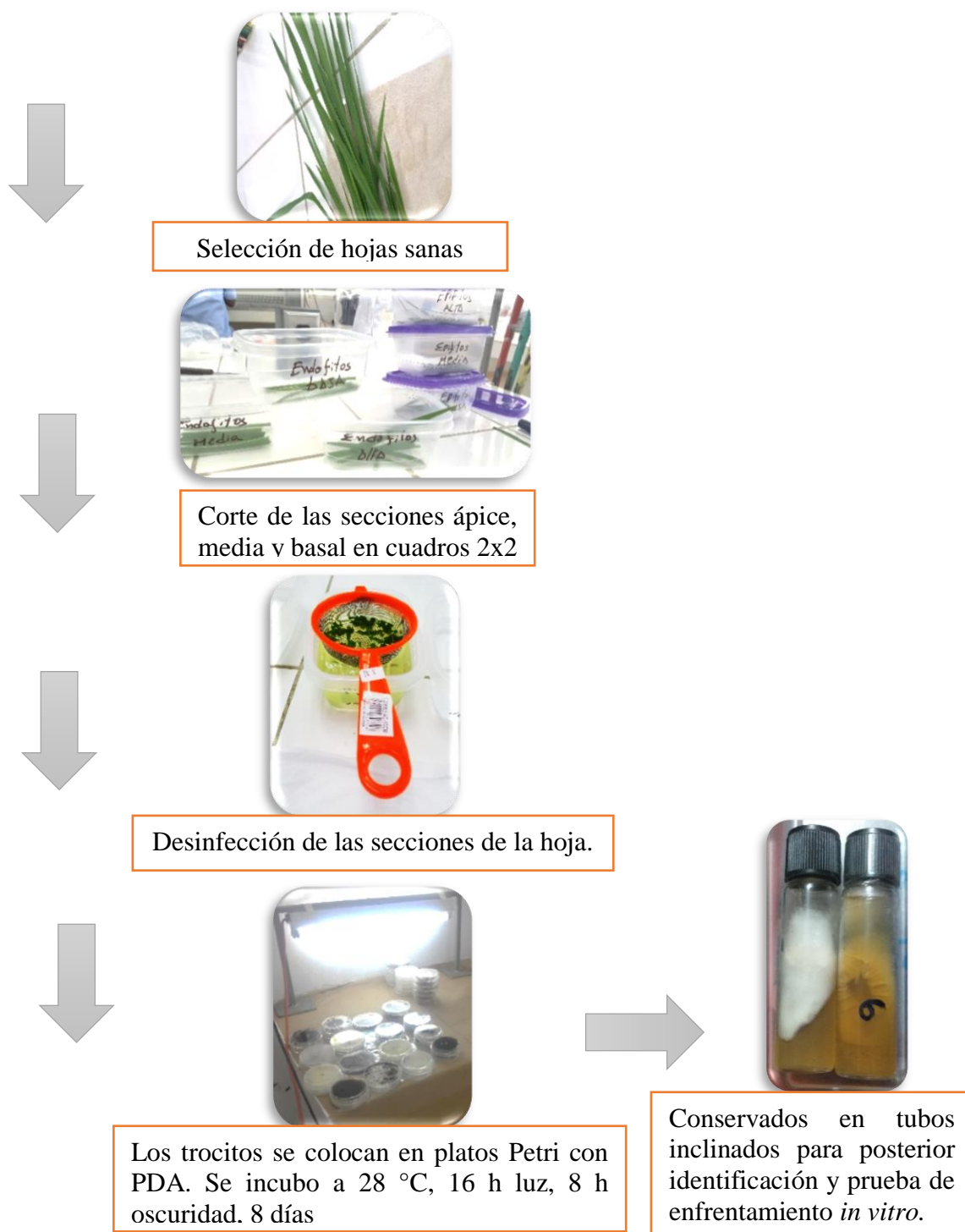


Figura 4. Diagrama para el aislamiento de hongos endófitos de la filósfera del arroz. Laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé -Universidad de Panamá.

4. Bioensayos de enfrentamiento *in vitro*

4.1. Bioensayo dual de las bacterias aisladas de la filósfera del arroz frente al fitopatógeno *B. glumae*.

Durante los ensayos de aislamiento de microorganismos, se obtuvieron bacterias epifíticas, por lo que los procesos de enfrentamiento *in vitro* ante *B. glumae*, fueron específicos para este tipo de microorganismos de la filósfera del arroz.

Se utilizó el método de difusión en agar sugerido por Cristancho y Agudelo, 2009. Las bacterias aisladas de la filósfera así como la *B. glumae*, fueron revivificadas en matraces de vidrio con 20 ml de agua peptonada durante 24 h a temperatura constante (32°C). Transcurrido este tiempo, se difundió *B. glumae* en TSA líquido (1:10), según la metodología de Bauer *et al.*, (1996). Luego de solidificado el medio de cultivo con el fitopatógeno, se trazaron líneas sobre el plato Petri para dividirlos en 4 secciones, colocando una gota de 3 µl de una de las bacterias epifíticas aisladas de la filósfera en cada apartado. Se trabajaron 3 réplicas del enfrentamiento dual y dos controles, uno de ellos sólo con la bacteria *B. glumae* difusa en TSA y otro con las bacterias aisladas de la hoja. Los ensayos se incubaron durante 24 h a 28°C.

La evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de la gota radial (mm), al segundo, quinto y octavo día de montado el ensayo. Se sustrajo el diámetro del halo de inhibición del diámetro de la colonia del posible antagonista (Astorga *et al.*, 2013). Aquellas bacterias que mostraron halos de inhibición \geq a 4 mm de diámetro en 2 de las 3 réplicas fueron consideradas como antagónica positiva ante el fitopatógeno.

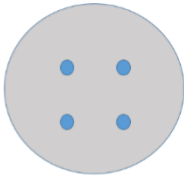
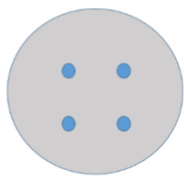

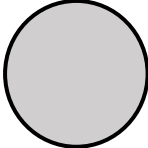
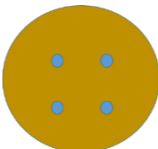
Enfrentamientos			Controles	Observación
Replica 1	Replica 2	Replica 3		
 <p><i>B. glumae</i> difusa en TSA</p> <p>●</p> <p>Bacterias aisladas de la sección apical, media y basal de la hoja.</p>	 <p><i>B. glumae</i> difusa en TSA</p> <p>●</p> <p>Bacterias aisladas de la sección apical, media y basal de la hoja..</p>	 <p><i>B. glumae</i> difusa en TSA</p> <p>●</p> <p>Bacterias aisladas de la sección apical, media y basal de la hoja.</p>	<p>Control 1</p> <p>Se coloca 1 ml de <i>B. glumae</i> en el plato Petri y luego se agrega agar TSA homogeneizando y dejando solidificar.</p>  <p><i>B. glumae</i> difusa en TSA</p>	<p>Los tratamientos se incubaron a temperatura ambiente.</p> <p>La evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de la gota radial (mm), el día 2, 5 y 8 luego de la inoculación.</p> <p>La presencia de halos de inhibición alrededor de la gota se consideró como una respuesta cualitativa antagónica entre cepas.</p> <p>Para el cálculo del potencial antagonista, se midió el diámetro del halo de inhibición y se restó del diámetro de la colonia de la bacteria.</p>
<p>Método: difusión en agar</p> <p>-Se coloca 1 mililitro de <i>B. glumae</i> en el plato Petri</p> <p>-Se agrega agar TSA homogeneizando y dejando solidificar.</p> <p>-Luego de solidificado se divide en 4 secciones, colocando en cada sección una gota (tres micro litros) de la bacteria aislada y previamente revivificada (una bacteria distinta en cada sección).</p>			<p>Control 2</p> <p>En un plato Petri con TSA, se colocan 3 µl de las soluciones bacteriana con las que se trabajan (una bacteria en cada sección).</p>  <p>Plato Petri con TSA</p> <p>●</p> <p>Bacterias aisladas de la filósfera.</p>	

Figura 5. Esquema de las pruebas de antagonismo *in vitro* entre las bacterias epifíticas aisladas y *B. glumae*.

4.2. Bioensayo dual de los hongos aislados de la filósfera del arroz frente al fitopatógeno *P. oryzae*.

Durante los ensayos de aislamiento de microorganismos, se obtuvieron hongos endófitos, por lo que los procesos de enfrentamiento *in vitro* ante *P. oryzae*, fueron específicos para este tipo de microorganismos de la filósfera del arroz.

En agar papa dextrosa (PDA), se colocó un disco de 7 mm de diámetro del hongo aislado e identificado a 15 mm del centro del plato, en el sentido opuesto también a 15 mm del centro, se colocó un disco (7 mm de diámetro) con el patógeno *P. oryzae* (Cepa facilitada por Luis Mejía, INDICASAT, Panamá). Los tratamientos se incubaron a 28°C y las mediciones se realizaron el día 3, 5 y 8 posterior al montaje del ensayo. Se utilizó como control, un disco del patógeno en el centro de un plato Petri con (PDA), (Figura 6).

Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (índice de inhibición), se consideró la fórmula:

$$*PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$$

“Donde *R1* es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y *R2* es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual). (Quirós, *et al.*, 2014)”

El criterio seleccionado para determinar el potencial antagónico según el porcentaje de inhibición fue tomado según la metodología propuesta por Benitez *et al*, (2007), así:

Negativo: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje menor de 10% y crecimiento normal de la colonia fúngica, de forma similar al control.

Baja: ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje entre 10–39% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

Media: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje entre de 40–69% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

Positivo: presencia de zona de inhibición definida o en un porcentaje entre 70–100%.

Los hongos que fueron identificados se criopreservaron en glicerol al 30% y posteriormente fueron ultracongelados a -80 °C.

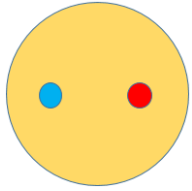
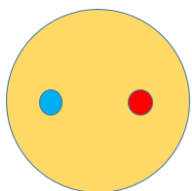
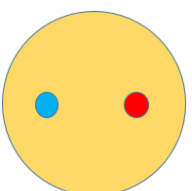
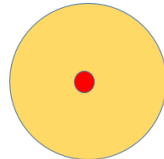



Enfrentamientos			Controles	Observación
Replica 1	Replica 2	Replica 3		
 <p>Plato Petri con PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la hoja.</p> <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	 <p>Plato Petri con PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la hoja.</p> <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	 <p>Plato Petri con PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la hoja.</p> <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	<p>Control 1</p>  <p>Se colocó un disco de 5 mm del fitopatógeno <i>P. oryzae</i> en un plato Petri con PDA.</p>  <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	<p>Se marcó una línea divisoria (centro del plato Petri), para observar la actividad del espacio de cada microorganismo.</p> <p>Se tomó la medida del crecimiento micelial del patógeno <i>P. oryzae</i> y se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula</p> $PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \cdot 100$ <p>Donde R_1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R_2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).</p>
<p>Método: Cultivo dual</p> <p>-En PDA, se sembrará un disco (5 mm) del hongo aislado a 15 mm del centro del plato,</p> <p>-En el sentido opuesto también a 15 mm del centro, se colocará un disco de 5 mm de diámetro del patógeno <i>Pyricularia</i>.</p>			<p>Control 2</p>  <p>Se colocó un disco de 5 mm de la cepa fúngica aislada de la hoja en un plato Petri con PDA.</p>  <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la hoja.</p>	<p>Los tratamientos se incubaron a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron los días 3, 5 y 8 al montaje de los enfrentamientos.</p>

Figura 6. Esquema de las pruebas de antagonismo *in vitro* entre las cepas fúngicas aisladas y *P. oryzae*.

5. Identificación de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz con capacidad antagónica.

Se consideró antagonista positivo a las que presentaron halo de inhibición \geq a 4mm de diámetro, se seleccionaron diez bacterias para ser identificadas.

Para la identificación de las cepas bacterianas con actividad antagónica contra *B. glumae*, se partió de la revivificación de la bacteria en estudio en agua peptonada, durante 24 h en un agitador orbital, posteriormente se realizó la tinción diferencial de gram para proceder con las pruebas bioquímicas API (Biomeriux®, Francia), éste es un método rápido que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas, además simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, porque proveen los reactivos listos para su uso o porque son totalmente automatizables (Benavides, 2007). Se utilizó una galería de API 20E gram positivas y una de API 50CH gram negativas para cada bacteria a identificar. Las galerías API se incubaron a 28°C en oscuridad por 72 h. Las observaciones se realizaron a las 24 h, 48 h y 72 h.

5.1. Cinética de crecimiento de bacterias con capacidad antagónica.

De las bacterias de la filósfera consideradas como antagonistas positivos; se tomaron 2 de ellas al azar para efectuar pruebas de cinética de crecimiento microbiano, con el fin de encontrar una relación entre la velocidad de duplicación del patógeno y de la bacteria de la filósfera, con la actividad antagónica que estas mostraron.

Para ello, se colocaron las cepas bacterianas a evaluar en matraces de vidrio con 20 ml de agua peptonada, dejándolas en agitación por 18 h a temperatura ambiente. Se determinó la densidad óptica de las 2 cepas seleccionadas y de la *B. glumae*. en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, cada 30 min durante 9 h. Se realizaron curvas de crecimiento microbiano con los datos obtenidos.

6. Identificación de hongos endófitos con capacidad antagónica.

De los crecimientos fúngicos, se tomaron puntos de hifas que fueron transferidos a PDA, para la obtención de cultivos monospóricos. Se realizaron microcultivos con la técnica de cámara húmeda, incubando a 28°C, alternado a 16 h luz y 8 de oscuridad, para identificar estructuras morfológicas típicas microscópicas y proceder a su identificación taxonómica; éstos fueron criopreservados en glicerol al 30% y ultracongelados -80 °C.

7. Variables evaluadas durante el aislamiento de bacterias y hongos de la filósfera del arroz.

Con los datos obtenidos se evaluaron diferencias significativas en el número total de aislamientos para las variables *fase fenológica*, *sección de la filósfera* y *diluciones* (Tabla 1).

Tabla 1. *Variables evaluadas.*

FASE FENOLOGICA DEL CULTIVO	SECCIÓN DE LA FILÓSFERA	DILUCIONES
<i>1. Fase Vegetativa</i>	<i>1. Sección Apical</i>	10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}
<i>2. Fase de Floración</i>	<i>2. Sección Media</i>	10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}
<i>3. Fase de Maduración</i>	<i>3. Sección Basal</i>	10^{-7}

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. BACTERIAS EPIFÍTICAS DE LA FILÓSFERA

1.1. Prospección de bacterias epifíticas de la filósfera del arroz.

En la prospección de las bacterias epifíticas de la filósfera se aisló un total de 65 bacterias. En la figura 7, se observa la distribución de los aislamientos (número de bacterias) por variable evaluada (Fase fenológica, sección de la hoja y dilución).

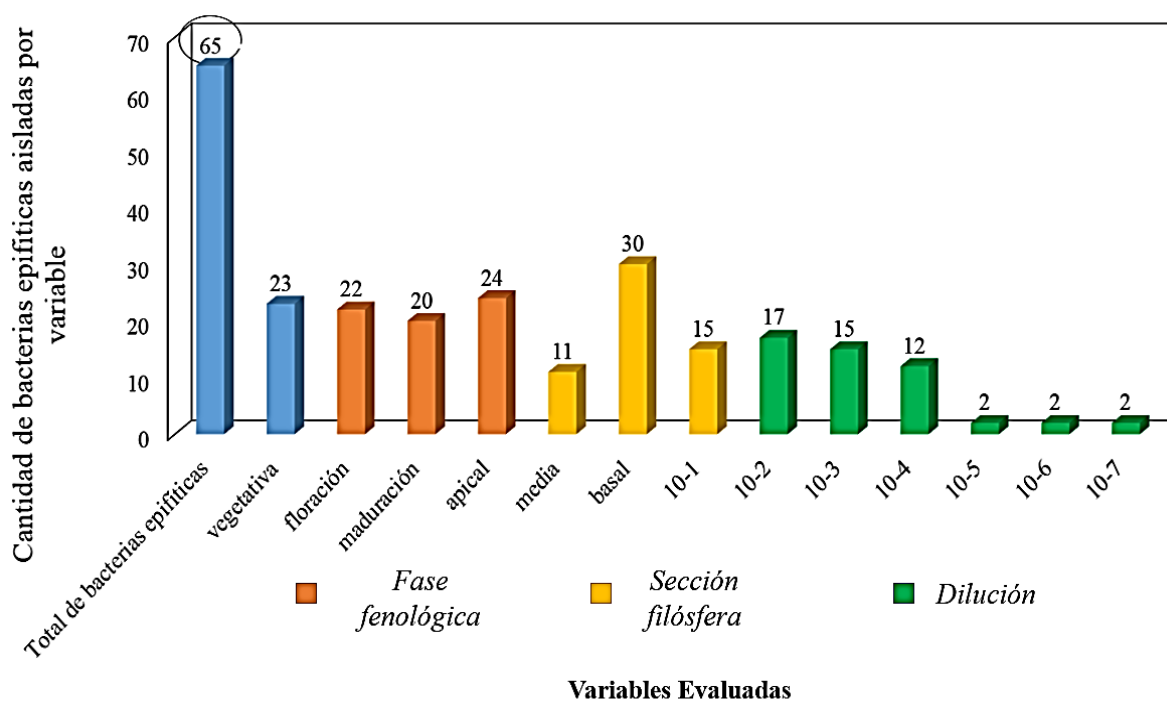


Figura 7. Prospección de bacterias epifíticas de la hoja. Variables analizadas: total de bacterias, fase vegetativa, sección de la hoja y diluciones.

El análisis de los datos se realizó por medio de pruebas no paramétricas dado que los mismos no presentaron una distribución normal. La figura 8, muestra los resultados totales obtenidos de los aislamientos realizados en 3 secciones de la hoja (apical, media, basal) de *Oryza sativa* por diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}). En la sección basal de la hoja, se registraron más aislamientos (30) en comparación a las demás secciones (dilución 10^{-2}).

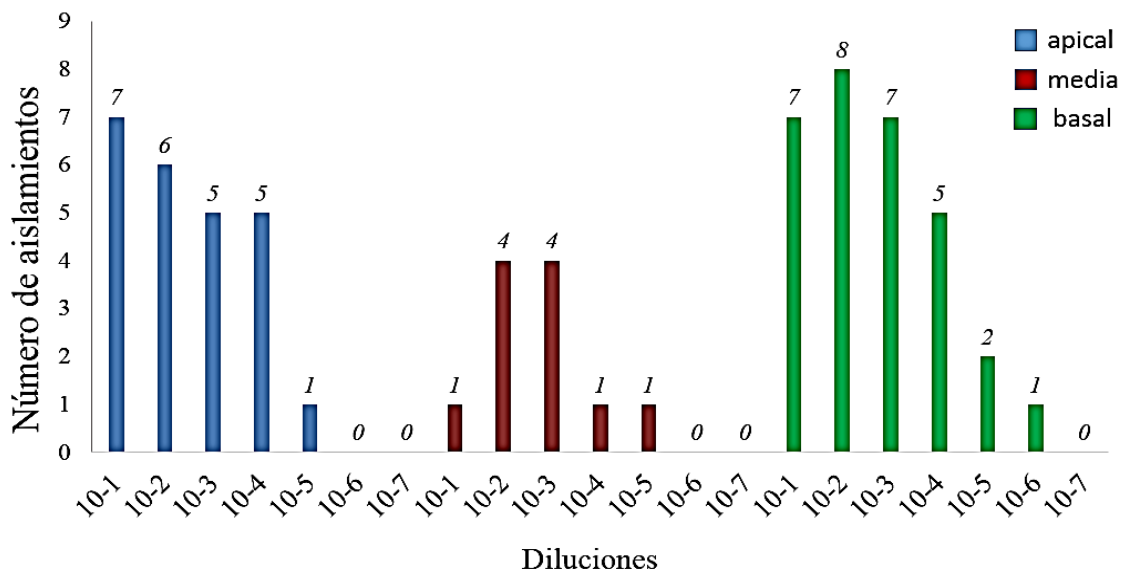


Figura 8. Número de aislamientos registrados en las distintas secciones de la hoja (apical, media, basal).

Los resultados demuestran que el número de aislamientos que se pueden obtener de la filósfera de la planta de arroz están relacionados con la variable *sección de la hoja* ($F=4.966$, g.l.= 2, $p=0.0086$) y la *dilución* obtenida durante los procesos de muestreo y segregación de la muestra ($F=5.770$, g.l.= 6, $p<0.0001$). Lo descrito concuerda con lo manifestado por Okubo *et al.*, (2014) y Sessitsch *et al.*, (2012) quienes señalan que las plantas de *arroz* representan un hábitat para diversos microorganismos, que colonizan las partes aéreas.

El número de aislamientos registrados durante las tres fases fenológicas, es estadísticamente similar ($F=0.107$, g.l.= 2, $p<0.8986$). El diseño experimental es capaz de explicar el 22% de los aislamientos ($R^2_{\text{ajust}}=0.2246$, $F=4.5635$, g.l.= 123, $p<0.0001$).

1.2. Cepas bacterianas epifíticas identificadas con potencial antagónico frente a *B. glumae*.

De las 65 bacterias epifíticas enfrentadas ante el fitopatógeno *B. glumae*, 24 cepas presentaron halo de inhibición ≥ 4 mm de diámetro, por lo menos en dos de sus 3 réplicas, de estas, se identificaron bioquímicamente las 10 cepas que presentaron mayor potencial antagonista (Figura 9), correspondiendo las 10 al género *Bacillus*.

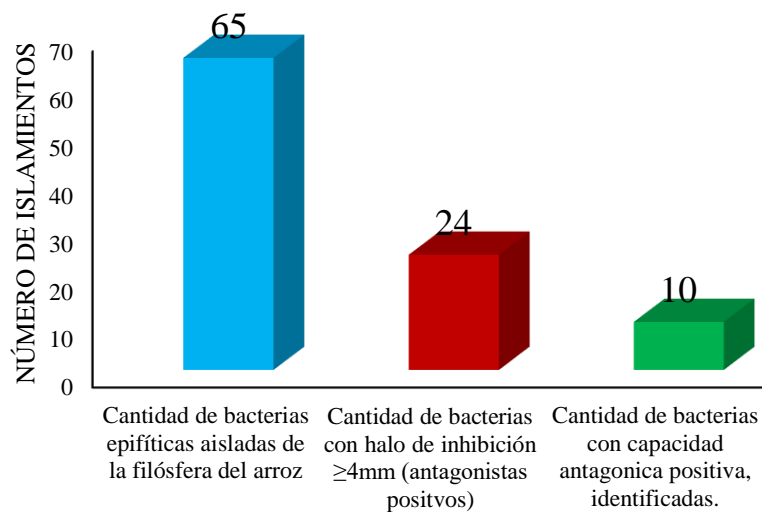


Figura 9. Cepas bacterianas aisladas de la filósfera del arroz, con diámetros en el halo de inhibición ≥ 4 mm.

Existieron diferencias significativas ($F= 4.966$, g.l.= 2, $p= 0.0086$), entre las cepas evaluadas en cuanto al diámetro del halo de inhibición contra *B. glumae*. Destacando el género *Bacillus* y particularmente la especie *B. subtilis* (Cepa 3) con el mayor diámetro de inhibición promedio, ante el fitopatógeno *B. glumae*. En la tabla 2 se puede observar que la tendencia de los datos indica que las cepas identificadas con la letra **a** corresponden a las mejores cepas, seguida por la **ab**, **b** y por último la **bc**.

Tabla 2. Valores medios del diámetro del halo de inhibición para el enfrentamiento entre bacterias epifíticas antagonistas frente a *B. glumae* en el cultivo de arroz.

<i>Microorganismo</i>	<i>Etapas</i>	<i>Sección</i>	<i>Dilución</i>	<i>Cepa</i>	<i>Diámetro (mm)</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	vegetativa	apical	10 ⁻³	cepa 3	14 a
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	apical	10 ⁻³	cepa 10	12 a
<i>Bacillus spp</i>	floración	apical	10 ⁻²	cepa 6	11 a
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	apical	10 ⁻¹	cepa 8	11 a
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	basal	10 ⁻¹	cepa 2	10 a
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	apical	10 ⁻³	cepa 4	9 ab
<i>Bacillus spp</i>	floración	basal	10 ⁻¹	cepa 9	9 ab
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	media	10 ⁻³	cepa 7	7 b
<i>Bacillus cereus</i>	vegetativa	apical	10 ⁻¹	cepa 1	6 bc
<i>Bacillus spp</i>	vegetativa	apical	10 ⁻³	cepa 5	6 bc
Promedio					9.5

Caldera (2011), evaluó 23 cepas bacterianas (sin identificar) contra *B. glumae*, encontrando diámetros del halo de inhibición inferior a 5 mm, mientras que en el presente estudio las 10 cepas bacterianas identificadas (antagonistas positivos) superaron los 6 mm, alcanzando un máximo de 14 mm (Cepa 3-*B. subtilis*) Figura 10.

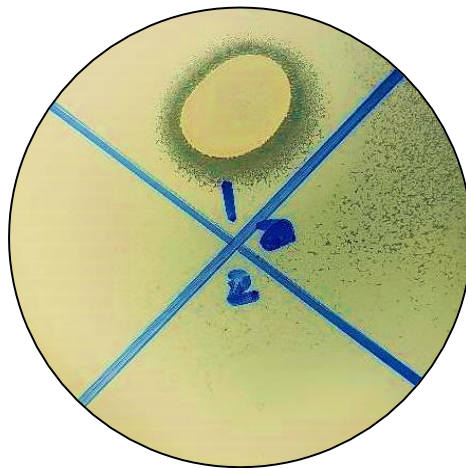


Figura 10. Bacteria epifítica *B. subtilis*, de la sección apical de la hoja, presenta halo de inhibición.

Las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces en los cultivos (Fernández 2001). Otros autores, han reportado la capacidad de miembros del género *Bacillus* de ejercer efecto biocontrolador sobre *P. oryzae* en el cultivo del arroz (Velusamy y Gnanamanickam 2008; Tejera *et al.*, 2011).

Las bacterias esporuladas del género *Bacillus spp* son efectivas para inhibir el desarrollo de hongos entre los que se destacan: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria solani* (Brewer y Larkin 2005; Guillén-Cruz *et al.*, 2006.). Ensayos *in vitro* han demostrado inhibición del crecimiento de *R. solani* mediante el uso de especies de *Bacillus* (Blanco, 2012)

1.3 Cinética de crecimiento bacteriano

Para considerar el aspecto cuantitativo de la interacción antagónica *bacteria de la filósfera-B. glumae*, se tomaron al azar 2 de las 10 cepas identificadas (bacterias epifíticas de la filósfera del arroz con antagonismo positivo) y se aplicó una prueba de cinética de crecimiento. Las cepas de la filósfera sometidas a esta prueba corresponden a un *Bacillus spp.* y a un *B. cereus* (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas seleccionadas para la cinética de crecimiento bacteriano.

Fase Fenológica	Sección de la Filósfera	Dilución	Microorganismo	Código de la cepa	Promedio del halo de inhibición a los 8 días
Floración	Basal	10 ⁻²	<i>Bacillus spp.</i>	FB10 ⁻² 2.1	6
Vegetativa	Apical	10 ⁻¹	<i>B. cereus</i>	BA10 ⁻¹ 2(1)	9

La cinética de crecimiento permite conocer la velocidad de multiplicación de las células bacterianas aisladas de la rizósfera del arroz en contraste a la cepa de *B. glumae*. Observamos en la tabla 4 y tabla 5 (Datos de absorbancia) que las células de ambas cepas epifíticas de la filosfera del arroz se multiplicaron más rápido que las de el patógeno *B. glumae*, durante el periodo evaluado (210 min).

Tabla 4. Datos de la absorbancia *Bacillus spp* vs *B. glumae*

TIEMPO (min)	Absorbancia <i>Bacillus spp</i>	Absorbancia <i>B. glumae</i>
0	0.146	0.111
30	0.201	0.156
60	0.268	0.171
90	0.410	0.271
120	0.615	0.424
150	0.630	0.490
180	0.736	0.608
210	0.912	0.734

Tabla 5. Datos de la absorbancia *B. cereus* vs *B. glumae*

<i>TIEMPO (min)</i>	<i>Absorbancia B. cereus</i>	<i>Absorbancia B. glumae</i>
0	0.170	0.111
30	0.210	0.156
60	0.245	0.171
90	0.373	0.271
120	0.477	0.424
150	0.503	0.490
180	0.587	0.608
210	0.774	0.734

En la figura 11 y figura 12 se aprecia la curva de crecimiento de las cepas bacterianas con antagonismo positivo en relación a la curva de crecimiento de *B. glumae*. Fue notoria la diferencia en la velocidad de multiplicación celular de la cepa de *Bacillus spp* en función de la *B. glumae* (Figura 11), a partir de los 60 min de ensayo y continuaba la tendencia a aumentar su crecimiento.

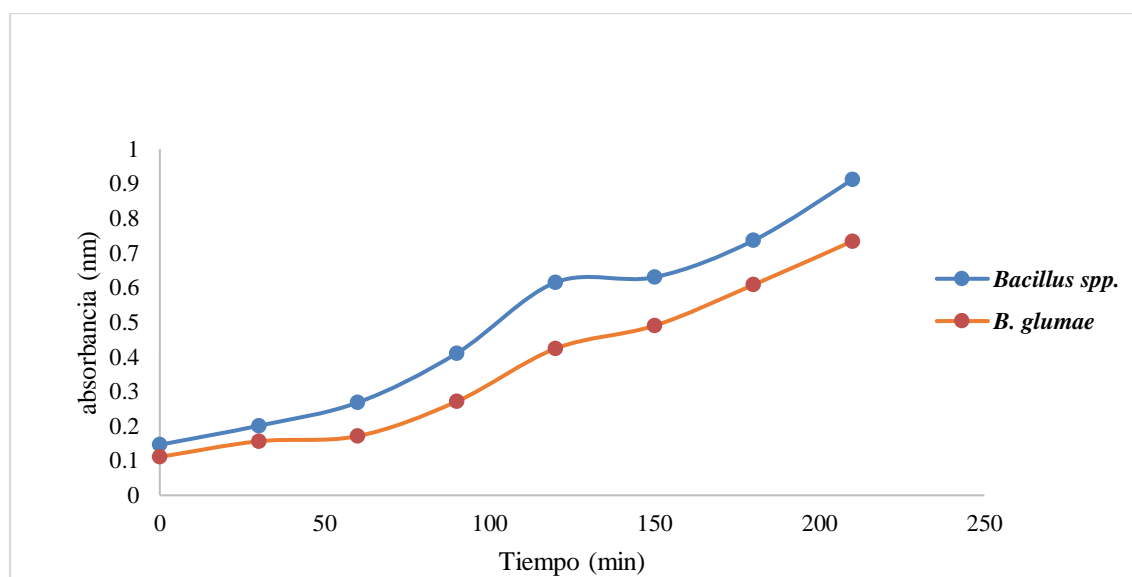


Figura 11. Curva de crecimiento *B. glumae* vs *Bacillus spp.*

Por su parte, para la cepa de *Bacillus cereus* se observó un mayor crecimiento en función de *B. glumae* (Figura 12) a partir de los 30 min de ensayo, sin embargo, entre los 150 y 200 min de ensayo el crecimiento de ambas bacterias fue similar, a los 210 min de ensayo la bacteria *B. cereus* incrementa su tasa de multiplicación con tendencia a continuar en fase exponencial superando a *B. glumae*.

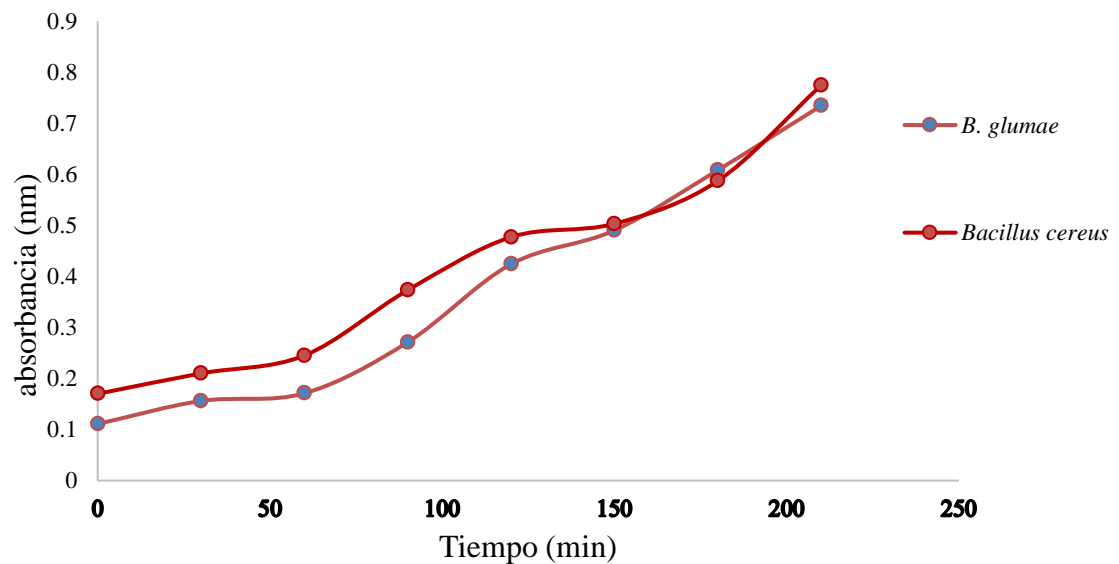


Figura 12. Cinética de crecimiento *B. glumae* vs *B. cereus*.

Con los resultados mostrados podemos deducir que la inhibición producida por las bacterias que mostraron antagonismo positivo frente a *B. glumae* tiene relación con la competencia a por los nutrientes. Las cepas bacterianas con capacidad antagónica, al presentar una tasa metabólica más elevada asimilan los nutrientes más rápido, duplicándose en menor tiempo que el patógeno y posiblemente generando los metabolitos secundarios que puede explicar el efecto inhibitorio en el crecimiento del patógeno mediante la formación de halos de inhibición (Artola, 2018).

2. HONGOS ENDÓFITOS DE LA FILÓSFERA

2.1. Prospección de hongos endófitos de la filósfera

Durante la prospección de hongos endófitos de la filósfera del arroz, se obtuvo un total de 68 aislamientos. En la Figura 13 se observan el número de cepas fúngicas obtenidas en cada una de las variables evaluadas (Fase fenológica, sección de la hoja).

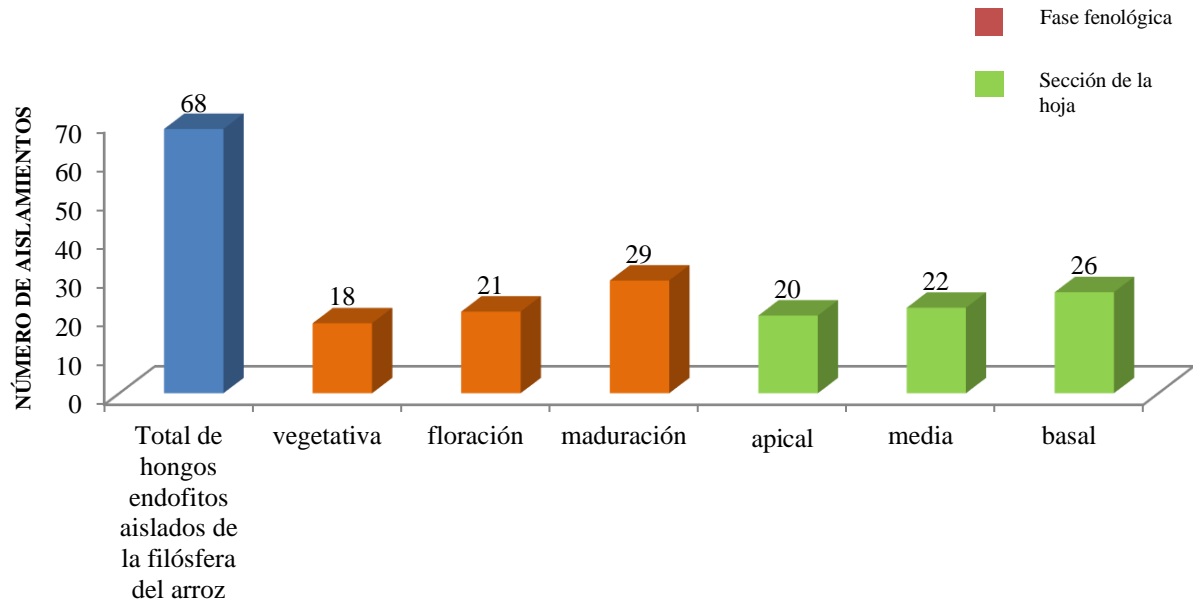


Figura 13. *Prospección de hongos endófitos de la filósfera con las variables: etapa fenológica y sección de la hoja.*

Como la distribución de los datos no es normal, se aplicó la prueba de Wicolxon/Kruskal-Wallis (no paramétrica), indicando que la sección basal de la hoja fue donde más se aislaron hongos endófitos. El modelo utilizado en la prospección de hongos endófitos autóctonos en la hoja del arroz explica en un 41% los aislamientos obtenidos (Tabla 6).

Tabla 6. *Resumen de ajuste para la prospección de hongos endófitos*

R cuadrado	0.471703
R cuadrado ajustado	0.410068
Raíz del error cuadrático medio	1.072431
Media de respuesta	6.065424
Observaciones (o suma de pesos)	68

2.2. Hongos endófitos identificados con potencial antagonístico frente a *P. oryzae*.

Del total de aislamientos fúngicos (68), de la filósfera del arroz, 29 mostraron antagonismo positivo (PICR $\geq 40\%$) correspondiendo a cuatro géneros (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*): *Trichoderma spp* (3 cepas), *A. flavus* (2 cepas), *A. niger* (9 cepas), *Penicillium spp* (6 cepas), *Fusarium spp* (9) cepas. (Figura 14). En la tabla 7 se describe la sección de la hoja de la cual se aisló cada género fúngico con actividad antagonística.

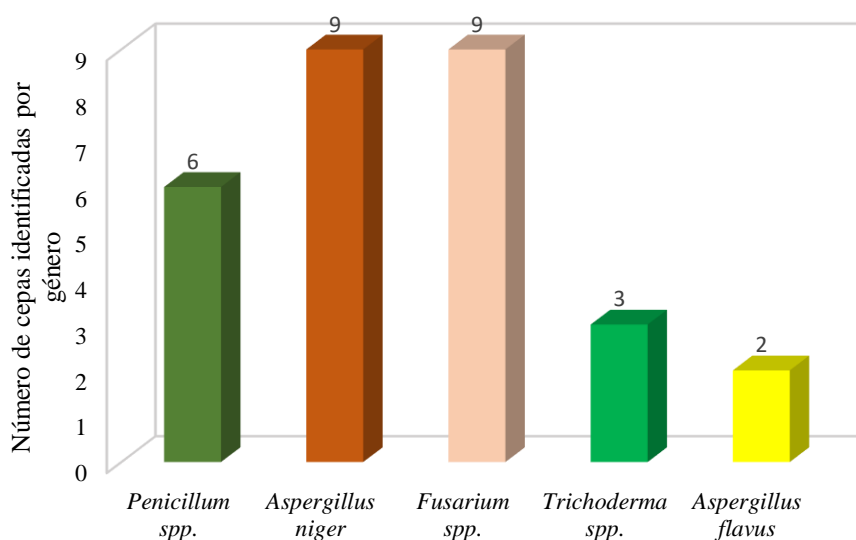


Figura 14. Hongos endófitos con antagonismo positivo: *Trichoderma spp*, *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium spp*, *Fusarium spp*

Tabla 7. Secciones de la hoja en las cuales se aislaron los géneros fúngicos con actividad antagónica positiva frente a *P. oryzae*.

Géneros	Sección de la hoja
<i>Penicillium spp.</i>	Apical
<i>Aspergillus flavus</i>	Basal, media
<i>Aspergillus niger</i>	Media, apical
<i>Fusarium spp.</i>	Apical, media, basal
<i>Trichoderma spp.</i>	Basal

En la figura 15 se muestran los PICR de los géneros fúngicos identificados con actividad antagónica positiva frente a *P. oryzae*, a los 8 días de observación. Como indicamos, se tomó como inhibición efectiva o positiva aquellas cepas en las que el crecimiento fúngico radial era mayor o igual a 40% (Figura 15), resultando *A. niger* con el mayor valor de PICR.

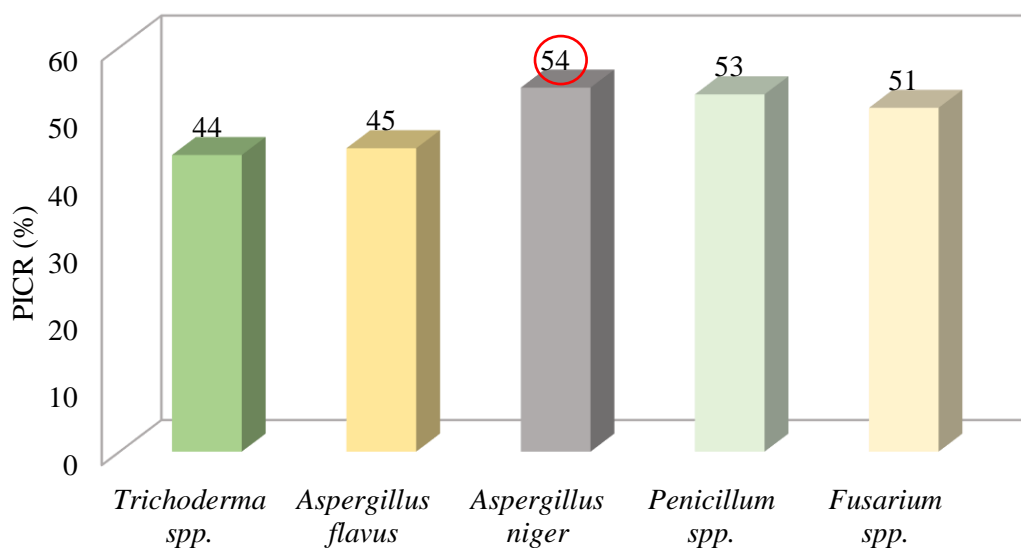


Figura 15. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de las cepas fúngicas con actividad antagónica positiva frente *P. Oryzae*.

Se realizó un diagrama caja barra para determinar el hongo con el mayor poder de inhibición frente al patógeno evaluado. La línea roja representa la media y la verde representa el valor de inhibición superior a 40%. Se aprecia que la mayoría de los datos se encuentran por arriba de la media. Por otra parte, se observa que los hongos *Fusarium spp* y *Penicillium spp* arrojaron gran cantidad de valores por debajo de la media, (Figura 16).

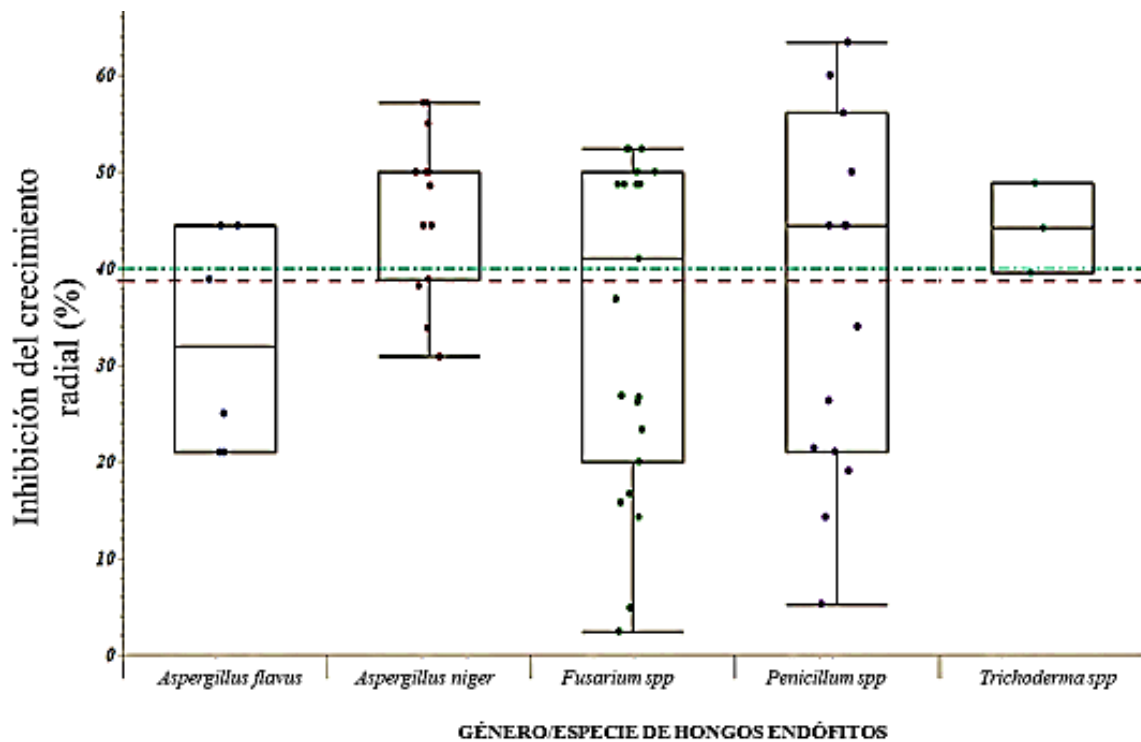


Figura 16. Inhibición del crecimiento de *P. oryzae* por hongos endófitos antagonistas aislados de la filósfera. Línea verde representa PCIR $\geq 40\%$, línea roja representa la media de los datos analizados.

A pesar de lo mencionado, los hongos endófitos identificados no presentan diferencia significativa en cuanto al porcentaje de inhibición frente al fitopatógeno *P. oryzae*. ($X^2 = 7.2824$, g.l. = 5, $p = 0.2005$).

Se han reportado cepas de *Aspergillus spp* con potencial antagónico, en el control de enfermedades fungosas como la causada por *Fusarium spp*, (Figura 17) observándose principalmente un efecto de inhibición por competencia (Quiróz-Sarmiento *et al.*, 2008), contrastando con lo reportado por Reyes *et al.*, (2012), quienes realizaron enfrentamientos duales con cepas de *Aspergillus spp* y *Trichoderma spp* contra *Fusarium sp* encontrando que las cepas de *Trichoderma spp* fueron estadísticamente superior a las cepas de *Aspergillus spp*

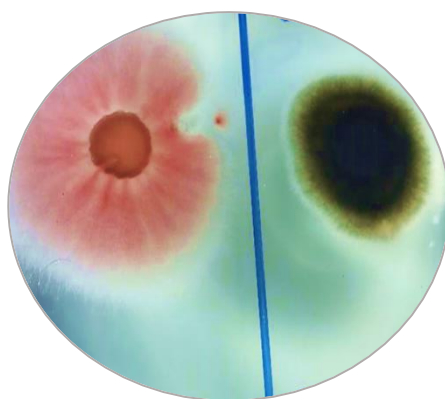


Figura 17. *Fusarium spp* (izquierda) localizado en la sección basal de la hoja, en enfrentamiento antagónico contra el fitopatógeno *P.oryzae* (derecha). Laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé-Universidad de Panamá.

Se tienen algunos reportes que describen el efecto antagónico de algunas especies de *Aspergillus* (Figura 18) hacia patógenos como *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2, y *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, los cuales son causantes de enfermedades en cultivos como tomate y melón (Quiroz-Sarmiento.*et al*, 2008)

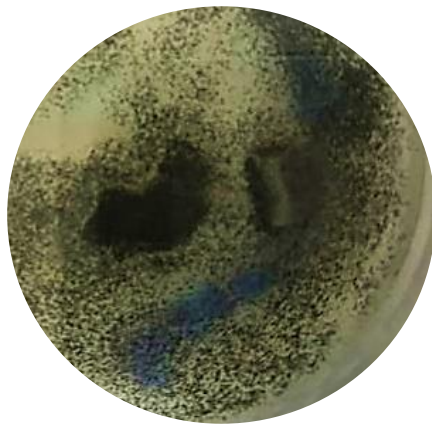


Figura 18. *A. niger* (derecha) en enfrentamiento contra el fitopatógeno *P. oryzae* (izquierda). Laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé-Universidad de Panamá.

El *Trichoderma* (Figura 19) también se ha utilizado en el control de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao, con reducción del área bajo la curva de esta enfermedad por la aplicación de cepas comerciales y nativas de especies de este agente de biocontrol (Villamil *et al.*, 2015). En el cultivo del plátano *Musa spp.* se ha informado el uso de microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* en el control de hongos foliares (Castro 2015).

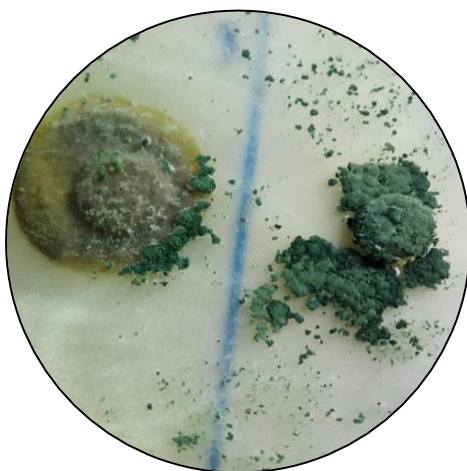


Figura 19. *Trichoderma spp* (derecha) en enfrentamiento contra el fitopatógeno *P. oryzae* (izquierda). Laboratorio de microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé-Universidad de Panamá.

La aplicación de *Trichoderma* en el arroz ha sido poco estudiada, sin embargo, en la última década se han obtenido resultados satisfactorios en el control de *P. oryzae* (Pérez *et al.*, 2017), todos ellos mediante la interacción *in vitro* entre hongos fitopatógenos del arroz y especies de *Trichoderma*.

Pérez-Torres *et al.*, (2018), encontraron eficiencias para la inhibición de *P. oryzae* con cepas de *Trichoderma harzianum* de 63, 75 y 82% utilizando 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} UFC respectivamente. Esos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio, ya que la cepa de *Trichoderma sp* (Cepa-17) presentó valores de inhibición de 44% a los 8 días de la inoculación.

IV. CONCLUSIONES

- Se aislaron un total de 65 bacterias epifíticas y 68 hongos endófitos de la filósfera del arroz (*Oryza sativa*) variedad Gab 8 bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia en Los Alveos de Antón.
- La densidad de población de las bacterias epifíticas aisladas varían respecto a las variables **sección de la filósfera** y **dilución**, resultando mayor número de cepas en la sección basal de la filósfera y en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .
- La densidad de población de los hongos endófitos aislados varían respecto a las variables **fase fenológica** y **sección de la filósfera**; resultando mayor número de cepas durante la fase de maduración y en la sección basal de la filósfera.
- Se identificaron 10 cepas bacterianas epifíticas de la filósfera del arroz, del género *Bacillus* (*Bacillus spp*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) con capacidad antagónica frente a *B. glumae*, con un halo de inhibición \geq a 4 mm de diámetro.
- Se identificaron 29 cepas de hongos endofíticos de la filósfera del arroz con capacidad antagónica positiva (PCIR \geq 40%) frente a *P. oryzae*, pertenecientes a los géneros *Trichoderma spp* (3 cepas), *A. flavus* (2 cepas), *A. niger* (9 cepas), *Penicillium spp* (6 cepas), *Fusarium spp* (9) cepas.

V. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de enfrentamiento de antagonistas de manera cruzada entre cepas de bacterias antagonistas contra *P. oryzae* y de cepas de hongos antagonistas contra *B. glumae*.
- Realizar pruebas de enfrentamiento entre las cepas de hongos y bacterias antagonistas evaluadas en este estudio con otros agentes fitopatógenos del cultivo del arroz de importancia económica en Panamá, como *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*.
- Hacer evaluaciones en casas de cultivo con las cepas que presentaron mejor potencial antagonista contra *P. oryzae* y *B. glumae* en el cultivo del arroz.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Artola, A. *Burkholderia glumae*, capacidad fitopatológica y presencia de antagonistas en siete variedades de arroz comerciales de Panamá. Universidad Latina de Panamá. 2018.
2. Astorga-Zaragoza et al., 2007. Performance monitoring of heat exchangers via adaptive observers. *Measurement*, 40 (2007), pp. 392-405
3. Ávila, C. C.; Goretti, R. M.; Lizcano T. R. 2014. Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). Colombia. 15-20.
4. Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists, 36(3), 49-52.
5. Bellido, J. 2005; CABI, 2005. Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de la cebolla. *Agriculture*, Universidad de Puerto Rico.
6. Benavides, H. (2007). Propuesta de Guía de Aplicación de Técnicas De Microbiología (Bacterias y Hongos) Para ser Utilizado en Microbiología General. El Salvador: Sistema Bibliotecario, Universidad de El Salvador. doi: <http://ri.ues.edu.sv/4768/1/16100029.pdf>.
7. Benitez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L., y Corrales, L. (2007). Aislamiento de los Microorganismos Cultivables De La Rizosfera De *Ornithogalum umbellatum* y Evaluación Del Posible Efecto Biocontrolador en dos Patógenos del Suelo. *NOVA*, 5(8), 147-153. doi:<http://dx.doi.org/10.22490/24629448.383>.
8. Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 4:1327- 50.
9. Blakeman, J. P.; Fokkema, N.J. 1982 "Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane." *Annual Review Phytopathology* 20 : 167-192.
10. Blanco-Zapata, DC. 2012. Evaluación De Bacilos Aerobios Formadores De Endosporas (Bafes) Para El Control Biológico De Rhizoctonia Solani Kuhn En El Cultivo De Papa Criolla (*Solanum Tuberosum* Grupo Phureja). Universidad Nacional de Colombia Biblioteca Digital. Colombia, 48-62. Disponible <http://www.bdigital.unal.edu.co/10703/>.
11. Brenner, D.J; Krieg, N.R; Staley, J.T; Garrity, G.M. 2005. *Manual of Systematic Bacteriology*, Segunda Edición. New York, USA. 590-596 p.

12. Brewer y Larkin 2005; Guillén-Cruz, R., & Hernández-Castillo, F., & Gallegos-Morales, G., & Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar-González, C., & Padrón-Corral, E., & Reyes-Valdés, M. (2006). *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (2), 105-114.
13. Caldera, María Alejandra. 2011. Evaluación in vitro de actividad antimicrobial de 23 cepas bacteriales no identificadas en contra de *Burkholderia glumae*. Tesis de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 32 p.
14. Castro, Rosa, Pesántez, Marcia, Flores, Valeria, Díaz, Carmen, Castro, Lidia, & Alvarado-Capó, Yelenys. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 133-138. Recuperado en 26 de junio de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200007&lng=es&tlng=pt.
15. Chaves, M. (2016). Comunicación Oral. Metodología para el Enfrentamiento *in vitro* de Hongos.
16. Chaves, N. P. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis presentada en opción al Título Académico de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 85 pp. Disponible en <http://www.sidalc.net/repdoc/a1654e/a1654e.pdf>.
17. Correa, F.; Pérez, C.; Saavedra, E. 2007. Añublo bacterial de la panícula del arroz. *Revista Arroz*, 57 (468), 26-32. Disponible en <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/anublo-bacterial-de-la-panicula>.
18. Cristancho, J. y Agudelo, D. (2009). Actividad Antagónica entre Bacterias Epibióticas Aisladas de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano y su Relación con la Macroepibiosis. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 25-38. Recuperado el 2017, http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012297612009000100002&lng=es&tlng=es.
19. Fernández, Orietta. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) No. 62. 96-100.
20. Fondo latinoamericano para arroz de riego. 2010. Patólogo colombiano sugiere medidas para manejo bacteria en arroz. *FLAR*. Consultado el 2 de abril 2018. Disponible en <http://www.flar.org/index.php/es/noticias/131>.

21. Franquet JM. 2004 Economía del Arroz: Variedades y Mejora. Primera edición - Edición electrónica gratuita España., 18-20p.
22. Graciano et al., 2006, Pérez Vargas, Josefina, Anaya Reza, Omar, Chang Solis, Carmen Kikey, Membrillo Venegas, Isabel de la Luz, Calva Calva Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras d nitrógeno crecidas en hidrocarburos. Revista CENIC. Ciencias Químicas 2010, 41 (Sin mes).
23. Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F.D., GallegosMorales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N., Padrón-Corral, E. y Reyes-Valdés, M.H., 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 24:105-114.
24. Hardoim PR, Overbeek L, Van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology. Vol. 16 (19), 463-471p. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X08001923>
25. Hernández, LG; Escalona, MA. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. Revista de Divulgación Científica y Tecnología dela Universidad Veracruzana, 16 (1), 19-25. Recuperado en <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num1/articulos/microorganismos/micro.htm>
26. Instituto Nacional de Estadística y Censo 2016. Panamá en cifras https://www.contraloria.gob.pa/INEC/Publicaciones/subcategoria.aspx?ID_CATEGORIA=17&ID_SUBCATEGORIA=45&ID_IDIOMA=1
27. Leveau, J. H.; Lindow. S.E. (2001). Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 98 (6), 3446-3453. Disponible en <https://doi.org/10.1073/pnas.061629598>.
28. Lindow, S; Brandl, M. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 1875-1883. Obtenido de <https://aem.asm.org/content/aem/69/4/1875.full.pdf>
29. Mondino, P. S. (2006). Control Biológico Postcosecha. Medidas para conservar fruta y hortalizas. , 1-158.
30. Muller, E. 1984. Problemas del cultivo del Arroz en los trópicos. Instituto Internacional de Investigación del Arroz/ Centro Internacional de Agricultura Tropical (*IIRI/CIAT*) 96-97p.

31. Okubo T et al., (2014); S. Ikeda, K. Sasaki, K. Ohshima, M. Hattori, T. Sato and K. Minamisawa. 2014. "Phylogeny and functions of bacterial communities associated with field-grown rice shoots. *Microbes Environmental*, 29(3): 329- 332. Accedido el 2 de junio 2015. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130883](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130883).
32. Pal, K. K.; McSpadden, G. B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. Disponible DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
33. Pérez Torres, Ernesto Juniors, Bernal Cabrera, Alexander, Milanés Virelles, Pausides, Leiva Mora, Michel, Sierra Reyes, Yurisandra, & Cupull Santana, René. (2017). Actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Centro Agrícola*, 44(3), 13-19. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025357852017000300002&lng=es&tlng=es.
34. Pérez, C.A. 2004: Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127 – 284 pp.
35. Pérez-Torres, E; Bernal-Cabrera, A; Milanés-Virelles, P; Sierra-Reyes, Y; Leiva-Mora, M; Marín Guerra, S; Monteagudo-Hernández, O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (Cepa A-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* Vol. 30, Nº 1. 17-26 pp.
36. Poveda, I., Cruz-Martín, M., Sánchez-García, C., Acosta-Suárez, M., Leiva-Mora, M., Roque, B., & Alvarado-Capó, Y. (2010). Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa spp.* con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal*, 10(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/272/246>
37. Quiroz E, 2014. Innovación Tecnológica para el Manejo Integrado del Cultivo de Arroz en Panamá. IDIAP (Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá).
38. Quiroz-Sarmiento, Vivian Francisca, Ferrera-Cerrato, Ronald, Alarcón, Alejandro, & Lara Hernández, María Encarnación. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista mexicana de micología*, 26, 27-34. Recuperado en 23 de febrero de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018731802008000100005&lng=es&tlng=es.
39. Reyes et al., (2012), R.A.; Alejo, J.C; Ruiz, S.E.; Tun, S.JM. 2012. Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium* sp. Aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, vol. 16, núm.3.
40. Riederer, M.; Muller. C. 2006. Biology of the plant cuticle. *Annual Plant Reviews*, Vol. 23, 444p. Falta en el texto

41. Sessitsch A **et al**, (2012), P. Hardoim, J. Döring, A. Weilharter, A. Krause, T. Woyke, B. Mitter, L. Hauberg-Lotte, F. Friedrich, M. Rahalkar, T. Hurek, A. Sarkar, L. Bodrossy, L. Van Overbeek, D. Brar, J.D. Van Elsas and B. Reinhold-Hurek. 2012. "Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis." *APS Journal*, 25(1):28–36. Los Banos, Laguna, Philippines.
42. Tejera-Hernández, B; Rojas-Badía, M; Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 42 (3), 131-138.. Recuperado en <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>.
43. Vargas, E. 2004. Contenido de elementos en la planta y su relación con la susceptibilidad a Bacteriosis. *Universidad de Costa Rica. Costa Rica*. 50 p.
44. Velusamy, P; Gnanamanickan S. 2008. The effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. *Soil Biology*. N°14. 93-106 pp.
45. Villamil, J.; Viteri, S.; Villegas, W. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*. 68(1):7441 - 7450.
46. Wilson D. (1995). Endophyte; The Evolution of a Term, and Clarification of its Use and Definition. *Oikos*; Vol. 73, No. 2 pp. 274-276. Disponible <https://www.jstor.org/stable/3545919>.

VII. ANEXOS

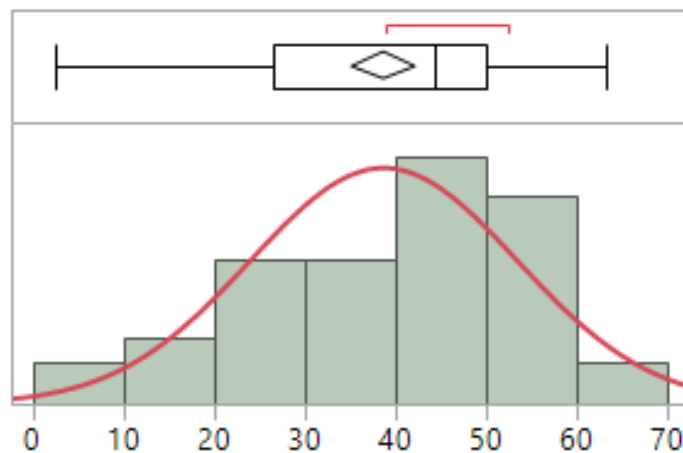
Índice de Anexos

1.	Prueba de normalidad de los datos obtenidos en la prospección de hongos de la filósfera del arroz	57
2.	Fichas micológicas	58
	<i>Penicillium spp</i>	58
	<i>Fusarium spp.</i>	59
	<i>Aspergillus niger</i>	60
	<i>Penicillium spp</i>	61
	<i>Aspergillus flavus</i>	62
	<i>Trichoderma spp.</i>	63
3.	Pruebas de Identificación API	64

1. Prueba de normalidad de los datos obtenidos en la prospección de hongos de la filósfera del arroz.

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de un conjunto de datos obtenidos durante el aislamiento de hongos endófitos de la filósfera. La probabilidad es inferior a 0,05 por la distribución de los datos bajo la campana da Gauss no es normal, (Figura 20).




PRUEBA Shapiro-Wilk		
W		Prob<W
0.937166		0.002








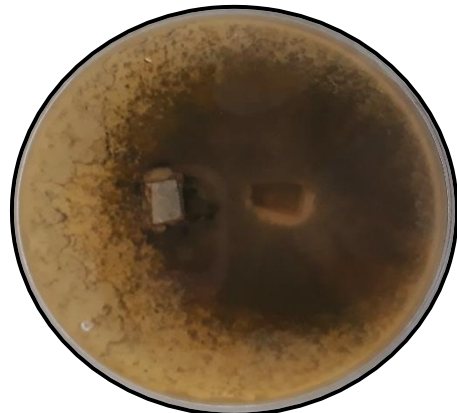

2. Fichas micológicas.


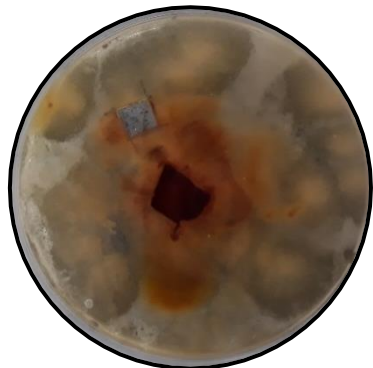
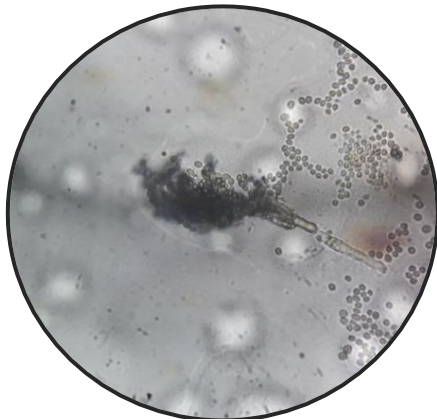
Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá

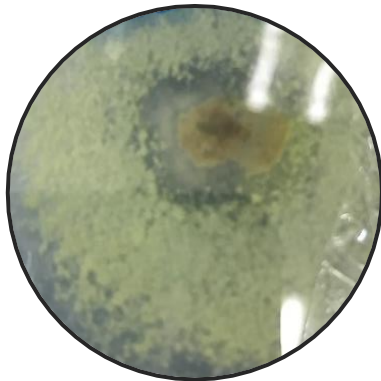
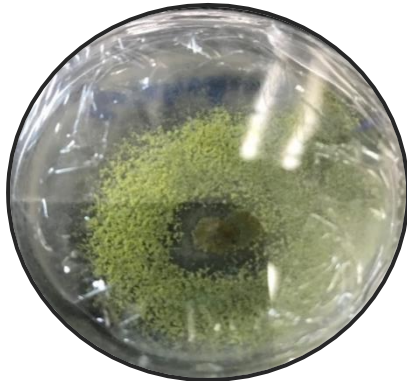

Responsables: Alex Cruz G. / Rito Herrera /Martha de Von Chong.

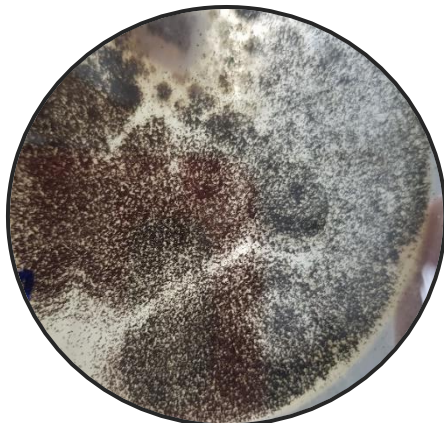
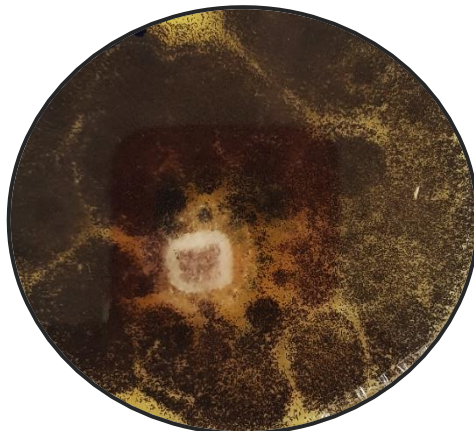

Microorganismo: <i>Penicillium spp.</i>		Placa: HFA1 T1		
Almacenamiento: Tubo inclinado con medio PDA.		Historial Aislamiento -Ciclo del cultivo: segundo -Fase del Cultivo: vegetativa -Sección de la hoja: alta	Custodio: Cepario Lab. U. Panamá, sede Coclé.	
Conservación: Tubos con Glicerol a -80°C.	Observación:	vegetativa	alta	1.HFA1
		vegetativa	alta	2.HFA1.2
		floración	alta	13.HFA1.
		maduración	alta	19.HFA 3.2
		maduración	alta	23.HFA 3.1
Condiciones de crecimiento: Plato Petri con medio PDA. Temperatura: 28 C°, 18 horas Luz y 6 de oscuridad				
Características Morfológicas				
Macroscópicas Anverso. Colonia algodonosa, de color verde oscuro, en el centro presenta coloración blanca, bordes redondos.		Reverso. Bordes color chocolatoso y en el centro se torna amarillo-cremoso.		
				
Microscópicas: hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides en forma de matraz; de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios				
				
Tipo de objetivo: 40x				

Microorganismo		<i>Fusarium spp.</i>		Placa: HFB3	
Almacenamiento: Tubo inclinado con medio PDA.		Historial Aislamiento -Ciclo del cultivo: Segundo -Fase del Cultivo: floración -Sección de la hoja: baja		Custodio: Cepario Lab. U. Panamá, sede Coclé.	
Conservación: Tubos con Glicerol a -80° C.		Observación:	Floración	baja	6.HFB 3.1
			Maduración	baja	17.HFB 3.1
			Maduración	baja	18.HFB 1.1
			Maduración	baja	25.HFB 3.2
Condiciones de crecimiento: Plato Petri con medio PDA Temperatura: 28 C°, 18 horas Luz y 6 de oscuridad					
Características Morfológicas					
Macroscópicas Anverso. Colonia algodonosa, de color blanco a rosado cuyo color se difunde en el medio.			Reverso. Se observa un crecimiento con una pigmentación rosado más oscuro.		
					
Microscópica Formación de macroconidias delgadas, de pared gruesa septadas, hialinas, y bien curvadas					
					
Tipo de objetivo: 40x					

Microorganismo		<i>Trichoderma spp.</i> Placa: Base Trichoderma			
Almacenamiento Tubo inclinado con medio PDA.		Historial Aislamiento -Ciclo del cultivo: Segundo -Fase del Cultivo: floración -Sección de la hoja: baja		Custodio: Cepario Lab. U. Panamá, sede Coclé.	
Conservación: Tubos con Glicerol a -80° C.		Observación: -	Maduración	baja	BASE TRICODERMA
Condiciones de crecimiento. Plato Petri con medio PDA Temperatura: 18 horas Luz y 6 de oscuridad.					
Características Morfológicas					
<u>Macroscópicas</u> Anverso. La colonia es verde oscuro con blanco en el centro, aterciopelada, algodonosa.			Reverso. Colonia marrón o verde oscuro.		
					
<u>Microscópica</u> Presenta hifas septadas, los conidióforos son segmentos cortos, con pequeños conidios de paredes lisas, de color verde.					
					
Tipo de objetivo: 40x					

Microorganismo		Penicillium spp. Placa: HFA 3.2 Mad			
Almacenamiento	Platos petri con agar PDA	Historial Aislamiento -Ciclo del cultivo: Segundo -Fase del Cultivo: Maduración -Sección de la hoja: alta		Custodio: Cepario Lab. U. Panamá, sede Coclé.	
Conservación: Tubos con Glicerol a -80° C.		Observación:	Floración	alta	13.HFA1.
			Maduración	alta	19.HFA 3.2
			Maduración	alta	23.HFA 3.1
Condiciones de crecimiento: Plato Petri con medio PDA Temperatura: 28 C°, 18 horas Luz y 6 de oscuridad					
Características Morfológicas					
<u>Macroscópicas</u> Anverso. Colonia algodonosa, de color verde oscuro, en el centro presenta coloración blanca, de bordes irregulares.			Reverso. Colonia de color chocolate oscuro en los bordes y en el centro se torna amarillo-cremoso.		
					
<u>Microscópica</u> Posee hifas septadas, con conidióforos ramificadas, las fiálides parecidas a un pincel, presenta conidios globosos que se observan como cadenas no ramificadas en el extremo de las fiálides.					
					
Tipo de objetivo: 40x					

Microorganismo		<i>Aspergillus flavus.</i> Placa: Base filósfera			
Almacenamiento	Platos petri con agar PDA	Historial Aislamiento -Ciclo del cultivo: Primer -Fase del Cultivo: Maduración -Sección de la hoja: baja		Custodio: Cepario Lab. U. Panamá, sede Coclé.	
Conservación: Tubos con Glicerol a -80° C.		Observación:	Maduración	baja	BASE
			Maduración	media	HFM4
Condiciones de crecimiento: Plato Petri con medio PDA .Temperatura: 28 C°, 18 horas Luz y 6 de oscuridad					
Características Morfológicas					
Macroscópicas Anverso. La colonia es de crecimiento rápido, superficie filamentosa, algodonosa, de color chocolate oscuro.			Reverso. La colonia es de color amarillo a crema, en el medio y en los bordes se va tornando a chocolate claro.		
					
Microscópica Presenta hifas septadas, los conidióforos son de pared lisa y largos color chocolate marrón, conidios globosos de coloración verde oscuro en masas.					
					
Tipo de objetivo: 40x					

Microorganismo		Aspergillus niger. Placa: HFM 1.1			
Almacenamiento	Platos petri con agar PDA	Historial Aislamiento -Ciclo del cultivo: Segundo -Fase del Cultivo: Vegetativa -Sección de la hoja: media		Custodio: Cepario Lab. U. Panamá, sede Coclé.	
Conservación: Tubos con Glicerol a -80° C.		Observación:	vegetativa	media	HFM 2.1
			vegetativa	media	HFM1
			vegetativa	media	HFM1.1
			maduración	alta	HFA1.2
Condiciones de crecimiento:Plato Petri con medio PDA Temperatura: 28 C°, 18 horas Luz y 6 de oscuridad					
Características Morfológicas					
Macroscópicas			Reverso. Coloración marón y negro.		
<p>Anverso.. Colonias de crecimiento rápido, de color blanco y con abundantes puntos negros, textura de granulosa a pulverulenta.</p> 					
Microscópica					
<p>Los conidióforos son largos, de pared lisa y oscura. Las conidias son globosas a subglobosas, de color marrón oscuro a negro y de paredes rugosas</p> 					
Tipo de objetivo: 40x					

3. Prueba Bioquímica de identificación API (20 E/50 CH)

